II

(Actos cuja publicação não é uma condição da sua aplicabilidade)

COMISSÃO

DIRECTIVA DA COMISSÃO

de 18 de Novembro de 1987

que adapta ao progresso técnico, pela nona vez, a Directiva 67/548/CEE do Conselho, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas

(87/302/CEE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Económica Europeia,

Tendo em conta a Directiva 67/548/CEE do Conselho, de 27 de Junho de 1967, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas (1), tal como foi alterada pela sexta vez pela Directiva 79/831/CEE (2), e, nomeadamente, o seu artigo 19º,

Considerando que o nº 1 do artigo 3º da Directiva 67/548/CEE determina que as propriedades físico-químicas, a toxicidade e a ecotoxicidade das substâncias e preparações devem ser determinadas segundo os métodos especificados no Anexo V;

Considerando que o nº 2 do artigo 3º da Directiva 67/548/CEE determina que a avaliação do perigo real ou potencial para o ambiente de uma substância ou preparação deve ser feita em função das características enumeradas nos Anexos VII e VIII;

Considerando que actualmente o Anexo V, na versão que lhe foi dada pela Directiva 84/448/CEE (3), inclui apenas os métodos de ensaio que correspondem às características especificadas no Anexo VII e que é igualmente necessário fornecer métodos de ensaio que correspondam às características especificadas no Anexo VIII;

Considerando que as disposições da presente directiva estão em conformidade com o parecer do Comité para a adaptação ao progresso técnico das directivas relativas à eliminação dos entraves técnicos ao comércio de substâncias e preparações perigosas,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1º

É aditado ao Anexo V da Directiva 67/548/CEE o texto do anexo da presente directiva.

Artigo 2º

Os Estados-membros adoptarão e publicarão, antes de 31 de Dezembro de 1988, as medidas necessárias para darem cumprimento à presente directiva. Desse facto informarão imediatamente a Comissão. Os Estados-membros aplicarão estas disposições a partir de 30 de Junho de 1989, o mais tardar.

Artigo 3º

Os Estados-membros são destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas, em 18 de Novembro de 1987.

Pela Comissão

Stanley CLINTON DAVIS

Membro da Comissão

(1) JO nº 196 de 16. 8. 1967, p. 1.
(2) JO nº L 259 de 15. 10. 1979, p. 10.
(3) JO nº L 251 de 19. 9. 1984, p. 1.

ANEXO

Os métodos de ensaio a seguir descritos destinam-se à determinação de algumas das propriedades toxicológicas e ecotoxicológicas enumeradas no Anexo VIII da Directiva 79/831/CEE do Conselho. São descritos os métodos de ensaio adequados ao nível 1 e níveis 2 do Anexo VIII, mas não se encontram subdivididos em função dos diferentes níveis.

ÍNDICE

	Página
PARTE B: Métodos para determinação da toxicidade	4
Introdução geral: Parte B	4
Toxicidade oral subcrónica: — teste de noventa dias em roedores (dose oral repetida)	8
Toxicidade oral subcrónica: — teste de noventa dias em espécies não pertencentes aos roedores (dose oral repetida)	12
Toxicidade dérmica subcrónica — teste de noventa dias em roedores	16
Toxicidade subcrónica por inalação — teste de noventa dias em roedores	20
Teste de teratogénese — roedores e não roedores	24
Teste de toxicidade crónica	27
Teste de carcinogénese	32
Teste de combinado de toxicidade crónica/carcinogénese	37
Teste de toxicidade sobre a reprodução em uma geração	43
Teste de toxicidade sobre a reprodução em duas gerações	47
Toxicocinética	51
Testes de mutagénese e despiste de carcinogénese	55
— Mutação génica — *Saccharomyces cerevisiae*	55
— Recombinação mitótica — *Saccharomyces cerevisiae*	58
— Células de mamífero *in vitro* — teste de mutação génica	61
— Lesão e reparação do ADN — síntese não programada — células de mamífero *in vitro*	64
— Teste *in vitro* de troca entre cromátides do mesmo cromossoma	68
— Teste de letalidade recessiva ligada ao sexo na *Drosophila melanogaster*	71
— Teste de transformação de células de mamífero *in vitro*	73
— Teste de letalidade dominante no roedor	76
— Citogenética de células germinais de mamífero, *in vivo*	79
— Teste das malhas *(spot-test)* no ratinho	82
— Translocação hereditária no ratinho	85
PARTE C: Métodos para determinação da ecotoxicidade	88
Introdução geral: Parte C	88
Ensaio de inibição do crescimento das algas	89
Toxicidade em relação às minhocas: ensaio utilizando solo artificial	95
Biodegradação: ensaio de Zahn e Wellens	99
Biodegradação: ensaios de simulação de lamas activadas	106
Biodegradação: ensaio de inibição da respiração	118
Biodegradação: ensaio L.A.S.C. modificado	123

PARTE B: MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE

INTRODUÇÃO GERAL: PARTE B

ESTUDOS A LONGO PRAZO

Estudos de toxicidade subcrónica, toxicidade crónica e carcinogénese

Caracterização da substância a testar e mistura utilizada no tratamento

Antes de iniciar qualquer estudo de toxicidade deve conhecer-se a composição da substância a testar, incluindo as suas impurezas principais, bem como as suas propriedades físico-químicas essenciais e a sua estabilidade.

As propriedades físico-químicas da substância a testar fornecem informações importantes para a escolha da via de administração, a concepção dos estudos subcrónicos, crónicos ou de carcinogénese, assim como para a manipulação e armazenamento da substância a testar. A informação sobre a estrutura química e as propriedades físico-químicas da substância pode também dar indicações sobre as características de absorção pela via de administração escolhida bem como sobre as possibilidades de distribuição tecidular e de metabolismo. Estudos anteriores de toxicidade e toxicocinética podem também fornecer informações sobre os parâmetros toxicocinéticos. O estudo deve ser precedido pela elaboração dum método analítico para as determinações qualitativa e quantitativa da substância a testar (incluindo as impurezas principais se possível) no veículo de administração e no material biológico.

Animais de experiência: selecção da espécie e estirpe

Uma vez que é necessário tratar os animais durante grande parte da sua vida, há tendência para limitar os estudos a espécies fáceis de criar em laboratório e com uma duração de vida relativamente curta. É muito conveniente o conhecimento da incidência das afecções e dos tumores espontâneos nos animais da estirpe utilizada, quando criados em condições semelhantes.

As estirpes devem ser bem caracterizadas e isentas de defeitos congénitos que possam interferir na experiência. O uso de estirpes consanguíneas (*inbred*) ou de híbridos F_1 apresenta algumas vantagens a esse respeito, mas sempre que se disponha de dados suficientes sobre os antecedentes de estirpes não consanguíneas, usando animais provenientes de colónias fechadas, estas poderão ser utilizadas.

Cuidados com os animais, regime alimentar e de ingestão de água

As experiências e os estudos em animais devem respeitar a legislação nacional e ter em conta princípios humanitários, assim como os últimos progressos internacionais em matéria de protecção dos animais. São imperativos um controlo rigoroso das condições de ambiente e técnicas adequadas ao tratamento dos animais se se quiser obter resultados significativos. Factores como as condições de alojamento, doenças intercorrentes, quimioterapia, presença de impurezas na alimentação, o ar, a água e a «cama», cuidados gerais com os animais e instalações, podem influenciar significativamente o resultado dos estudos de administração repetida. Em geral deve conhecer-se o efeito de produtos químicos esterilizantes sobre o estudo.

A dieta deve satisfazer todas as necessidades de nutrição da espécie testada e deve ser isenta de impurezas susceptíveis de influenciar o resultado do ensaio. A alimentação e a água serão fornecidas *ad libitum* aos roedores, sendo a alimentação substituída pelo menos semanalmente. Presentemente utilizam-se três tipos de dieta: convencional, sintética e regimes de fórmula livre.

Seja qual for a dieta escolhida os fornecedores devem garantir, com controlos periódicos, o valor nutritivo e o nível de contaminantes da dieta de base; devem também fornecer esta informação ao laboratório em cada lote de alimentação. É muito conveniente conhecer os efeitos do regime alimentar no metabolismo, assim como no desenvolvimento de tumores e na longevidade dos animais.

Além disso, o laboratório que faz os testes pode efectuar uma contra-análise da dieta de base para controlar os componentes alimentares e contaminantes involuntários, incluindo os carcinogéneos. Neste caso, os resultados das análises serão conservados e incluídos no relatório final consagrado a cada substância a testar.

Os constituintes alimentares correntes com influência conhecida na carcinogénese (por exemplo anti-oxidantes, ácidos gordos insaturados, selénio) não devem estar presentes em concentrações passíveis de interferência. Devido ao impacto potencial de vários contaminantes correntes da dieta na avaliação da carcinogénese, torna-se necessário prestar uma atenção especial à presença na alimentação de resíduos de pesticidas, de compostos organoclorados, de hidrocarbonetos aromáticos policlínicos, de estrogénios, de metais pesados, de nitrosaminas e de micotoxinas.

São indispensáveis testes de estabilidade quando a substância a testar é administrada na água ou na alimentação. Devem ser feitos testes de estabilidade e homogeneidade bem conduzidos antes de se iniciar estudos de administração repetida para detetminar a frequência necessária de preparação e controlo da dieta.

Se os alimentos forem esterilizados, deverão conhecer-se os efeitos desse procedimento sobre a substância a testar bem como sobre os constituintes da dieta. Deverão efectuar-se os ajustamentos considerados adequados.

Durante os testes de carcinogénese, os investigadores devem ser informados sobre os contaminantes da água utilizada. A água considerada própria para consumo humano é geralmente de qualidade satisfatória, devendo dispôr-se de dados sobre a sua composição.

Pode ser necessário ajustar a concentração da substância testada no regime alimentar à medida que os animais crescem, de forma a manter mais ou menos constante a ingestão da substância testada em função do peso corporal.

O valor nutritivo da dieta de controlo e das dietas testadas deve ser o mais semelhante possível. Deve, assim, ter-se em conta o valor nutritivo da substância testada e incorporada na dieta. A experiência mostra que, se não atingir 5 % da dieta, uma substância não nutritiva testada não parece interferir significativamente com o valor nutritivo da dieta.

1. Estudos por inalação

Não se especifica nenhum teste limite por não ter sido possível definir um valor limite de exposição para uma inalação única.

2. Estudos de teratogénese

O método de ensaio destina-se essencialmente à via oral. Podem ser utilizadas outras vias em função das propriedades físicas da substância a testar ou da via mais provável de exposição humana. Nestes casos, o método do ensaio deve ser convenientemente adaptado tomando em consideração as informações obtidas no teste de 28 dias.

3. Toxicocinética

Os estudos de toxicocinética facilitam a interpretação e a avaliação dos dados toxicológicos. Estes estudos têm por fim elucidar alguns aspectos particulares da toxicidade do produto testado e os resultados obtidos podem ser úteis na concepção de outros estudos de toxicidade. Não é considerado necessário determinar todos os parâmetros para cada caso: isso será apenas necessário nos raros casos de sequência completa do estudo toxicocinético (absorção, excreção, distribuição e metabolismo). Para alguns compostos pode ser aconselhável uma modificação desta sequência ou pode ser suficiente um estudo com uma dose única.

Definições

Toxicocinética:	estudo da absorção, distribuição, metabolismo e excreção das substâncias a testar;
Absorção:	processo(s) pelo(s) qual (quais) uma substância administrada penetra no organismo;
Excreção:	processo(s) pelo(s) qual(quais) a substância administrada e/ou seus metabolitos são eliminados do organismo;
Distribuição:	processo(s) pelo(s) qual(quais) a substância absorvida e/ou os seus metabolitos se repartem no organismo;
Metabolismo:	processo(s) pelo(s) qual(quais) a substância administrada é estruturalmente modificada no organismo por reacções enzimáticas ou não enzimáticas.

4. Estudo de toxicidade aguda e subaguda numa segunda espécie

Um estudo numa segunda espécie visa completar as conclusões tiradas do estudo na primeira espécie.

No caso de um estudo numa segunda espécie, o método de ensaio já descrito pode ser utilizado ou adoptado a um menor número de animais.

5. Estudos de fertilidade

Quando é necessário um estudo de reprodução até à terceira geração, o método descrito para o ensaio de reprodução em duas gerações pode ser alargado à terceira geração.

6. Estudo de mutagénese

Testes complementares de mutagénese, incluindo testes de despiste de carcinogénese

No Anexo VIII da directiva mencionam-se testes complementares destinados ao estudo da mutagénese ou detecção de carcinogénese. Os ensaios descritos nesta parte podem geralmente ser utilizados na investigação de ambas.

Introdução

A avaliação inicial da actividade mutagénica duma substância consiste em ensaios que detectam as mutações génicas (*pontuais*) em bactérias, assim como as lesões citogenéticas em células de mamífero (*in vitro* ou *in vivo*). Os métodos adequados para estes estudos de base foram descritos préviamente. Esta parte trata dos estudos complementares, permitindo verificar e/ou completar os resultados obtidos nos ensaios de base e podendo ser utilizados nomeadamente para:

1. Confirmar resultados obtidos nos ensaios de base.
2. Estudar os fenómenos não examinados nos ensaios de base.
3. Iniciar ou aprofundar estudos *in vivo*.

Para estes efeitos, a gama de testes descritos compreende organismos eucariotas *in vitro* e *in vivo*, assim como uma extensa gama de fenómenos biológicos. Os testes permitem obter informações sobre as mutações pontuais que se dão nos organismos mais complexos que as bactérias utilizadas nos ensaios de base, e completam as informações sobre a capacidade duma substância para induzir aberrações cromossómicas.

São também descritos testes que utilizam fenómenos diferentes das mutações pontuais e aberrações cromossómicas. Estes testes fornecem informações complementares e podem ser utilizados em programas de investigação.

Como regra geral, qualquer programa de estudos complementares de mutagénese deveria ser concebido de forma a fornecer informações suplementares relevantes sobre o potencial mutagénico e/ou carcinogénico dessa substância.

A escolha do estudo apropriado em cada caso específico dependerá de múltiplos factores, nomeadamente das características físicas e químicas da substância, dos resultados dos primeiros testes bacteriológicos e citogenéticos, do perfil metabólico da substância, dos resultados de outros estudos de toxicidade e das utilizações conhecidas da substância. Dada a variedade de factores a ter em conta, não é possível o estabelecimento dum programa rígido para a selecção dos testes. No entanto, podem servir de orientação alguns princípios gerais: quando um teste se revelar positivo nos ensaios de base, os estudos complementares deveriam incluir pelo menos um teste capaz de detectar o mesmo fenómeno genético. Quando ambos os testes de base se revelarem negativos, devem normalmente ser efectuados como exames complementares testes para detectar as mutações genéticas e para detectar as aberrações cromossómicas. Pode também tornar-se necessário obter informações complementares de testes indicadores (ver lista abaixo). Os métodos que permitem efectuar estas investigações encontram-se agrupados em baixo, de acordo com a sua principal consequência genética.

Estudos para detecção de mutações génicas (pontuais)

Para investigar mais profundamente a capacidade duma substância induzir mutações génicas (pontuais), pode ser utilizado um dos seguintes testes:

a) Estudo de mutação «forward» *(forward mutation)* ou de mutação reversível (*reverse mutation*), em microorganismos eucariotas (*Saccharomyces cerevisiae*);

b) Estudos *in vitro* para detecção de mutações «forward» em células de mamíferos;

c) Prova do gene letal recessivo ligado ao sexo na *Drosophila melanogaster;*

d) Ensaio de mutação somática *in vivo*: prova das malhas (*spot-test*) no ratinho.

Estudos para detectar aberrações cromossómicas

Para investigar mais profundamente a capacidade duma substância induzir aberrações cromossómicas, pode ser utilizado um dos seguintes testes:

a) Estudos citogenéticos *in vivo* em mamíferos.

A análise *in vivo* da metafase das células de medula óssea deve ser considerada se não estiver já incluída na avaliação inicial (testes de base); além disso pode ser estudada a citogenética das células germinais *in vivo*;

b) Estudos citogenéticos *in vitro* em células de mamíferos, se estes não constarem da avaliação inicial;

c) Estudos de gene letal dominante nos roedores;

d) Prova de translocação com transmissão hereditária no ratinho.

Testes indicadores de efeitos sobre o DNA

Existem alguns métodos que permitem evidenciar certos efeitos sobre o DNA mas cujo fenómeno «final» não é uma manifestação mutagénica. Estes estudos podem dar informações, completando as obtidas com os estudos de mutagénese, e podem revelar-se úteis para a interpretação destes. Se for necessário efectuar estes testes, é possível aplicar um destes três métodos utilizando microorganismo eucariotas ou células de mamíferos:

a) Recombinação mitótica em *Saccharomyes cerevisiae;*

b) Lesão e reparação de DNA — síntese não-programada de DNA — células de mamíferos *in vitro;*

c) Troca entre cromátides do mesmo cromossoma(*sister-chromatid*)em células de mamífero (*in vitro*);

Outros testes indicadores de potencial carcinogénico

Os ensaios de transformação de células de mamíferos permitem medir a capacidade duma substância induzir, numa cultura celular, alterações morfológicas e de comportamento que se supõe estarem associadas com a transformação maligna *in vivo*. Podem ser utilizados vários tipos celulares e diferentes critérios de transformação.

Avaliação do risco de efeitos hereditários nos mamíferos

Existem vários métodos permitindo medir, nos mamíferos, os efeitos hereditários induzidos por mutações génicas (pontuais) [por exemplo: a prova do *locus* específico no ratinho(1)] ou por aberrações cromossómicas (por exemplo: a prova de translocação com transmissão hereditária no ratinho). Estes métodos podem ser utilizados para avaliar o risco genético que pode representar uma substância para o homem. No entanto, dada a complexidade destes ensaios e o elevado número de animais que requerem, em particular a prova do *locus* específico, deve existir uma justificação suficientemente forte para a sua utilização.

(1) O teste do *locus* específico no ratinho (que não está descrito neste documento) pode ser utilizado para medir a mutação que ocorre nas células germinais após a exposição a uma substância mutagénica, e posta em evidência na primeira geração. É possível detectar e quantificar as alterações génicas que levam a modificações nos produtos génicos traduzindo-se por fenótipos visíveis.

TOXICIDADE ORAL SUBCRÓNICA:

TESTE DE NOVENTA DIAS EM ROEDORES (DOSE ORAL REPETIDA)

1. MÉTODOS

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma

1.4. Princípio do método de ensaio

A substância a testar é administrada diariamente por via oral em doses graduais à razão de uma dose por grupo por um período de noventa dias. Durante o período de administração, os animais são observados diariamente para se detectarem manifestações de toxicidade. Os animais que morrem durante a experiência são autopsiados e, no fim da experiência, os animais sobreviventes são igualmente autopsiados.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Os animais são mantidos nas condições de alojamento e de alimentação da experiência durante pelo menos cinco dias antes do teste. Antes do teste, os animais jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos de tratamento e de controlo.

A substância a testar pode ser administrada com a comida por *gavage*, em cápsulas ou na água de beber. As doses devem ser administradas aos animais da mesma maneira durante toda a experiência. No caso de se utilizar um veículo ou outros aditivos, para facilitar a administração, estes devem ser comprovadamente isentos de efeitos tóxicos. Podem ser utilizados dados de experiências anteriores, se necessário.

Condições experimentais

Animais de experiência

Salvo contra-indicação, a espécie preferida é o rato. Devem utilizar-se animais jovens e sãos duma estirpe corrente de laboratório; o ideal seria começar a administração da substância antes dos ratos atingirem a idade de seis semanas sendo forçoso o início antes das oito semanas. No início da experiência, a diferença de peso entre os animais não poderá ultrapassar ± 20 % do peso médio. Se um estudo oral subcrónico constituir a fase preliminar dum estudo a longo prazo, deve utilizar-se a mesma espécie e estirpe em ambos os estudos.

Número e sexo

Para cada dose serão utilizados pelos menos vinte animais (dez fêmeas e dez machos). As fêmeas deverão ser nulíparas e não grávidas. Se for previsível sacrificar alguns animais durante a experiência, devem acrescentar-se ao número inicial o número dos animais que se prevê ir sacrificar. Para além destes, poderá haver um grupo satélite de vinte animais (dez animais de cada sexo) tratado com a dose mais elevada durante noventa dias e observado quanto à reversibilidade, persistência ou aparecimento tardio de efeitos tóxicos durante vinte e oito dias após o tratamento.

Doses

São utilizadas pelo menos três doses diferentes e um controlo; os animais do grupo de controlo serão tratados da mesma maneira que os animais dos grupos da experiência com excepção do tratamento com a substância a testar. Se se utilizar um veículo para facilitar a administração, este será administrado ao grupo de controlo da mesma forma que aos grupos tratados e o volume recebido deverá corresponder ao do grupo tratado com a dose mais elevada. A dose mais elevada deve produzir efeitos tóxicos mas não provocar nenhuma ou poucas mortes. A dose mais baixa não deverá produzir quaisquer efeitos tóxicos. Se se dispuser de informação sobre a exposição humana, a dose mais baixa deverá ser inferior ao seu valor. O ideal seria a dose intermédia produzir o efeito tóxico mínimo observável. Se se utilizarem várias doses intermédias, a diferença entre elas será calculada de forma a conseguir-se uma gradação dos efeitos tóxicos.

Nos grupos das doses mais baixa e intermédia assim como no grupo de controlo, a incidência de mortalidade deverá ser baixa para permitir uma avaliação significativa dos resultados.

Quando a substância a testar for incorporada na alimentação pode utilizar-se seja uma concentração alimentar constante (ppm ou mg/kg de alimento) seja uma dose constante em relação com o peso corporal dos animais; deve ser especificado o método escolhido.

No caso de uma substância administrada por *gavage,* a dose deve ser administrada diariamente sempre à mesma hora. As doses serão modificadas semanalmente ou quinzenalmente a fim de se manter uma dose constante em relação ao peso corporal do animal.

Teste limite

Se já tiver sido efectuado um teste de noventa dias, de acordo com o método a seguir descrito, com uma dose de 1 000 mg/kg. peso corporal/dia ou com uma dose mais elevada em função da possibilidade de uma exposição humana — quando conhecida — que não tenham provocado qualquer efeito tóxico, será inútil prosseguir a experiência. Quando se trata de substâncias pouco tóxicas incorporadas na alimentação é importante assegurar-se que as quantidades e outras propriedades da substância a testar não interferem com as exigências normais de nutrição.

Período de observação

Todos os animais devem ser observados diariamente e registados os sinais de toxicidade bem como o momento do seu aparecimento, sua intensidade e duração. Devem ser registados o momento da morte e os momentos de aparecimento e desaparecimento das manifestações de toxicidade.

Procedimento

Nas condições ideais a substância a testar será administrada aos animais sete dias por semana num período de noventa dias. Os animais de todos os grupos satélites que forem objecto de observações complementares serão mantidos vivos durante vinte e oito dias, sem tratamento, para se detectar a recuperação ou persistência dos efeitos tóxicos.

Durante o período de observação dos animais em cativeiro convém registar todas as alterações da pele e do pêlo, dos olhos e membranas mucosas, assim como dos aparelhos respiratório e circulatório, dos sistemas nervosos autónomo e central, da actividade somatomotora e do comportamento. Deve determinar-se semanalmente o consumo alimentar (e o consumo de água quando a substância a testar for administrada na água de beber) e também o peso dos animais.

Devem observar-se regularmente os animais para se evitarem perdas, tanto quanto possível, por causas como canibalismo, autólise dos tecidos ou condições impróprias de alojamento. No fim da experiência, todos os animais sobreviventes dos grupos tratados não satélites serão autopsiados. Os animais moribundos serão imediatamente retirados e autopsiados.

Os exames que a seguir se enunciam são normalmente feitos a todos os animais incluindo os controlos:

a) Um exame oftalmológico usando um oftalmoscópio ou equipamento adequado equivalente deve ser feito antes da administração da substância a testar e no fim da experiência, de preferência a todos os animais, mas pelo menos nos grupos da dose mais elevada e de controlo. Se se detectarem alterações oculares devem examinar-se todos os animais;

b) Um exame hematológico será efectuado no fim da experiência, compreendendo os seguintes testes: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem de leucócitos, fórmula leucocitária, bem como um estudo da coagulação e tempo de coagulação, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina, ou contagem de plaquetas;

c) a determinação de dados bioquímicos no sangue deve ser feita no fim da experiência. Apresentam um interesse geral para todos os estudos a avaliação do equilíbrio electrolítico, do metabolismo dos hidratos de carbono, da função hepática e renal. A escolha dos testes específicos será influenciada por observações relativas ao modo de

acção da substância a testar. Sugere-se o doseamento do cálcio, fósforo, cloretos, sódio, potássio, glicose em jejum (o período de jejum dependerá da espécie), transaminase glutâmico-pirúvica sérica (1), transaminase glutâmico oxaloacética sérica (2), ornitina-descarboxilase, gama-glutamil transpeptidase, azoto ureico, albumina, creatinina plasmática, bilirubina total e as proteínas séricas totais. As outras análises eventualmente necessárias a uma avaliação toxicológica adequada incluem análises de lípidos, hormonas, equilíbrio ácido-básico, methemoglobina e actividade colinesterásica. Podem efectuar-se outras análisés bioquímicas clínicas, se necessário, para aprofundar o estudo dos efeitos observados;

d) Um exame regular da urina não é necessário; este exame só é indicado em caso de efeitos tóxicos prováveis ou manifestos.

Se a informação de estudos anteriores não for apropriada deverá considerar-se a necessidade de determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos clínicos antes de começar a experiência.

Autópsia

Todos os animais serão submetidos a uma autópsia geral compreendendo o exame da superfície exterior do corpo, de todos os orifícios, bem como das cavidades craniana, toráxica e abdominal e respectivos conteúdos. O fígado, os rins, as supra-renais e os testículos serão pesados, ainda húmidos, o mais rápidamente possível depois da dissecação para se evitar a perda de líquidos por evaporação. Os seguintes orgãos e tecidos deverão ser conservados num meio adequado na eventualidade de um exame histopatológico ulterior: todas as lesões macroscópicas, encéfalo — incluindo cortes da medula/protuberância, córtex cerebeloso e córtex cerebral, hipófise, tiróideia/paratiróideia, todo o tecido tímico, traqueia e pulmões, coração, aorta (glândulas salivares), fígado, baço, rins supra-renais, pâncreas, gónadas, útero, (orgãos genitais anexos), (pele), esófago, estômago, doudeno, jejuno, íleo, cego, cólon, recto, bexiga, gânglio linfático representativo, (glândula mamária na fêmea), (musculatura da coxa), nervo periférico, esterno com medula óssea, (olhos), (fémur, incluindo superfície articular), (medula espinhal a três níveis — cervical, mediotoráxica e lombar), (glândulas lacrimais). Os tecidos mencionados entre parênteses só serão examinados em caso de aparecimento de sinais de toxicidade ou de compromisso de orgão alvo.

Exame histopatológico

a) Serão objecto de um exame histopatológico completo os orgãos e tecidos dos animais dos grupos tratados com a dose mais elevada e de controlo;

b) Todas as lesões macroscópicas serão examinadas;

c) Os orgãos alvo dos animais dos grupos tratados com outras doses deverão ser examinados;

d) Os pulmões dos grupos expostos às doses baixa e intermédia(s) serão submetidos a um exame histopatológico para se detectar qualquer sinal de infecção, uma vez que isso nos permite uma avaliação conveniente do estado de saúde dos animais. Deverá considerar-se a necessidade de um exame histopatológico do fígado e dos rins nestes grupos. Outros exames histopatológicos poderão não se justificar para os animais desses grupos, mas devem ser sempre efectuados aos orgãos que apresentem lesões, no grupo tratado com a dose mais elevada;

e) Quando se usar um grupo satélite, será feito um exame histopatológico dos tecidos e dos orgãos apresentando sinais de toxicidade nos grupos de trabalho.

2. **Resultados**

Os dados devem ser resumidos sob a forma de quadros, para cada grupo de experiência, indicando o número de animais no início desta, o número de animais apresentando lesões e a percentagem de animais com cada tipo de lesão. Os resultados deverão ser avaliados com um método estatístico apropriado. Pode utilizar-se qualquer método estatístico reconhecido.

3. **RELATÓRIO**

3.1. **Relatório do teste**

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

— espécie, estirpe, origem, condições do ambiente, dieta,

— condições do teste,

— doses (incluindo veículo, se utilizado) e concentrações,

— resposta tóxica, por sexo e por dose,

(1) Conhecida actualmente por transminase da alanina.
(2) Conhecida actualmente por transminase do aspartato.

— dose sem efeitos, se possível,

— momento da morte durante o estudo ou indicação dos animais sobreviventes no fim da experiência,

— descrição dos efeitos tóxicos ou outros,

— momento da observação de qualquer manifestação anormal e sua evolução,

— dados relativos à alimentação e peso corporal,

— observações oftalmológicas,

— testes hematológicos efectuados e seus resultados,

— testes bioqímicos clínicos utilizados e seus resultados (incluindo resultados das análises de urina),

— resultados da autópsia,

— descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas,

— tratamento estatístico dos resultados, se possível,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **Referências**

Ver Introdução geral, Parte B.

TOXICIDADE ORAL SUBCRÓNICA:

TESTE DE NOVENTA DIAS EM ESPÉCIES NÃO PERTENCENTES AOS ROEDORES (DOSE ORAL REPETIDA)

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma

1.4. Princípio do método de ensaio

A substância a testar é administrada diariamente por via oral, a vários grupos de animais de experiência (não roedores) à razão de uma dose por grupo durante um período de noventa dias. Durante o período de administração os animais são observados diariamente para se detectarem manifestações de toxicidade. Os animais que morrem durante a experiência são autopsiados e no fim da experiência os animais sobreviventes são igualmente autopsiados.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Os animais são mantidos nas condições de alojamento e de alimentação da experiência pelo menos durante cinco dias antes do teste. Antes do início do teste os animais jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos submetidos ao tratamento e de controlo.

A substância a testar pode ser administrada na comida ou em cápsulas se for mais conveniente. Podem ser usados outros métodos de administração oral. As doses serão administradas aos animais da mesma forma durante toda a experiência. No caso de se utilizar um veículo ou outros aditivos para facilitar a administração estes devem ser comprovadamente não tóxicos. Podem ser usados dados de experiências anteriores.

Condições experimentais

Animais de experiência

A espécie de não roedores mais utilizada é o cão, de preferência de raça definida. Podem ser utilizadas outras espécies não roedoras. Utilizar-se-ão animais jovens e sãos e, no caso do cão, o teste deverá começar de preferência na idade de quatro a seis meses e nunca depois dos nove meses. Se um estudo subrónico oral constituir a fase preliminar de um estudo a longo prazo deve utilizar-se a mesma espécie/raça em ambos os estudos.

Número e sexo

Serão utilizados para cada dose pelo menos oito animais (quatro fêmeas e quatro machos); o número de animais sobreviventes no fim da experiência deve ser suficiente para permitir uma avaliação significativa dos efeitos tóxicos.

Doses

São utilizadas pelo menos três doses diferentes e um controlo. Os animais do grupo de controlo são tratados da mesma maneira que os animais do grupo de experiência com excepção do tratamento com a substância a testar. A dose mais elevada deverá produzir efeitos tóxicos mas não a morte do animal; a dose mais baixa não deverá

produzir quaisquer efeitos tóxicos. Se se dispuser de informação sobre a exposição humana, a dose mais fraca será superior a este valor. O ideal seria que a dose intermédia produzisse o efeito tóxico mínimo observável. Se se utilizarem várias doses intermédias, a diferença entre elas será calculada de forma a conseguir-se uma gradação dos efeitos tóxicos.

Nos grupos das doses baixa e intermédia assim como no grupo controlo não deverá haver morte de animais.

Quando se trata de substâncias pouco tóxicas incorporadas na alimentação é importante assegurar-se que as quantidades de substância a testar envolvida não interferem com a alimentação normal.

Quando a substância a testar for incorporada na comida pode utilizar-se seja uma concentração alimentar constante (ppm ou mg/kg de comida) seja uma dose constante em relação com o peso corporal dos animais; deve ser especificado o método escolhido. Quando a substância é administrada directamente, por exemplo numa cápsula, a dose será dada todos os dias à mesma hora; se necessário, será adaptada semanalmente a fim de se manter uma dose constante em relação ao peso corporal do animal. Se um estudo subcrónico constituir uma fase preliminar de um estudo a longo prazo, deve utilizar-se um regime alimentar análogo em ambos os estudos.

Teste Limite

Se já tiver sido efectuado um teste de noventa dias de acordo com o método descrito abaixo, com uma dose de 1 000 mg/kg peso corporal/dia ou com uma dose mais elevada em função da possibilidade de uma exposição humana — quando conhecida — que não tenha provocado quaisquer efeitos tóxicos, pode considerar-se inútil prosseguir a experiência. Quando se administram na comida substâncias pouco tóxicas é importante certificar se as suas quantidades ou outras propiedades não interferem com as exigências normais de alimentação.

Período de observação

Todos os animais deverão ser observados diariamente e registadas as manifestações de toxicidade incluindo o momento do seu aparecimento, sua intensidade e duração. Serão registados o momento da morte assim como o do aparecimento e desaparecimento das manifestações de toxicidade.

Procedimento

Nas condições ideais a substância a testar será administrada aos animais sete dias por semana durante um período de noventa dias. Desde que a substância a testar não seja administrada na comida admite-se que por razões essencialmente práticas seja administrada cinco vezes por semana. As observações incluirão, pelo menos, as modificações do pêlo e da pele, dos olhos e das membranas mucosas, do aparelho respiratório, do aparelho circulatório, do sistema nervoso autónomo e central assim como a actividade somatomotora e do comportamento. O consumo alimentar (e de água quando a substância a testar é administrada na água de beber) assim como o peso dos animais serão determinados semanalmente.

Proceder-se-á diariamente a um exame clínico atento dos animais e tomar-se-ão medidas para reduzir o número de perdas de animais. No termo da experiência todos os animais sobreviventes são autopsiados. Os animais moribundos são retirados imediatamente e autopsiados. Os exames que a seguir se enunciam são normalmente feitos a todos os animais incluindo os controlos:

a) Um exame oftalmológico usando um oftalmoscópio ou equipamento adequado equivalente deve ser feito antes da administração da substância a testar e no fim da experiência de preferência a todos os animais, ou pelo menos nos grupos da dose mais elevada e de controlo. Se se detectarem alterações oculares devem examinar-se todos os animais;

b) Um exame hematológico será efectuado quer no início da experiência quer no fim, incluindo os seguintes testes: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem de leucócitos, fórmula leucocitária bem como um estudo da coagulação pelo tempo de coagulação, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina, ou contagem de plaquetas;

c) A determinação de dados bioquímicos no sangue deve ser feita no princípio da experiência, depois todos os meses ou só a meio, e no fim da experiência. Apresentam um interesse geral para todos os estudos a avaliação do equilíbrio electrolítico, do metabolismo dos hidratos de carbono, da função hepática e renal. A escolha dos testes específicos será influenciada por observações relativas ao modo de acção da substância a testar. Sugere-se o doseamento do cálcio, fósforo, cloretos, sódio, potássio, glicose em jejum (o período de jejum dependerá da espécie), transaminase glutâmico-pirúvica sérica (1) transaminase glutâmico oxaloacética sérica (2), ornitina-

(1) Conhecida actualmente por transaminase da alanina.
(2) Conhecida actualmente por transaminase do aspartato.

descarboxilase, gama-glutamil transpeptidase, azoto ureico, albumina, creatinina plasmática, bilirubina total e as proteínas séricas totais. As outras análises eventualmente necessárias a uma avaliação toxicológica adequada incluem análises de lípidos, hormonas, equilíbrio ácido-básico, methemoglobina e actividade colinesterásia. Podem efectuar-se outras análises bioquímicas clínicas, se necessário, para aprofundar o estudo dos efeitos observados. Os animais não roedores serão submetidos a uma dieta durante um determinado período de tempo (não ultrapassando as 24 horas) antes de se colher o sangue;

d) Um exame regular da urina não é necessário; este exame só é indicado no caso de efeitos tóxicos prováveis ou manifestos. Se a informação de estudos anteriores não for apropriada deverá considerar-se a necessidade de determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos clínicos antes de começar a experiência.

Autópsia

Todos os animais serão submetidos a uma autópsia geral que incluirá o exame da superfície exterior do corpo, de todos os orifícios e das cavidades craniana, toráxica e abdominal e respectivos conteúdos. O fígado, os rins, as glândulas suprarenais, a tiróideia (assim como as paratiróideias) e os testículos serão pesados ainda húmidos o mais rapidamente possível depois da dissecação para se evitar a perda de líquidos por evaporação. Os seguintes orgãos e tecidos deverão ser conservados num meio adequado na eventualidade de um exame histopatológico ulterior: todas as lesões macroscópicas, encéfalo — incluindo cortes da medula/da protuberância, córtex cerebeloso, córtex cerebral, hipófise, tiróideia/paratiróideia, todo o tecido tímico, (traqueia), pulmões, coração, aorta, glândulas salivares, fígado, baço, rins, glândulas supra-renais, pâncreas, gónadas, útero (orgãos genitais anexos), (pele), vesícula biliar, esófago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, cego, cólon, recto, bexiga, gânglio linfático representativo, (glândula mamária na fêmea), musculatura da coxa), nervo periférico, (olhos), esterno com medula óssea, (fémur, incluindo superfície articular) e (medula espinhal a três níveis — cervical, mediotoráxica e lombar). Os tecidos mencionados entre parênteses só serão observados em caso de aparecimento de sinais de toxicidade ou de compromisso do orgão alvo.

Exame histopatológico

Serão objecto de um exame histopatológico completo todos os orgãos e tecidos dos animais do grupo de controlo e do grupo exposto à dose mais elevada. Nos outros grupos tratados faz-se um exame histopatológico de todos os orgãos que apresentam lesões no grupo tratado com a dose mais elevada ou naqueles em que as observações clínicas indiquem a sua necessidade.

2. RESULTADOS

Os resultados serão resumidos na forma de quadros indicando, para cada experiência, o número de animais no início do ensaio, o número de animais apresentando lesões, o tipo de lesão e a percentagem de animais com cada tipo de lesão. Os resultados serão avaliados por meio de um método estatístico apropriado. Pode ser utilizado qualquer método estatístico reconhecido.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deve incluir as seguintes informações:

— espécie, raça estirpe, origem, condições do ambiente, dieta,

— condições experimentais,

— doses (incluindo veículo, se utilizado) e concentrações,

— resposta tóxica por sexo e dose,

— dose sem efeito, se possível,

— momento da morte durante a experiência ou indicação dos animais sobreviventes no fim da experiência,

— descrição dos efeitos tóxicos ou outros,

— momento da observação de qualquer manifestação anormal e sua evolução,

— dados relativos à alimentação e peso corporal,

— observações oftalmológicas,

— exames hematológicos efectuados e resultados,

— provas bioquímicas clínicas utilizadas e seus resultados (incluindo resultado das análises de urina),

— resultados da autópsia,

— tratamento estatístico dos resultados se possível,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados,

— descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

TOXICIDADE DÉRMICA SUBCRÓNICA:

TESTE DE NOVENTA DIAS EM ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

A substância a testar é aplicada diariamente em doses graduais na pele dos animais dos vários grupos, à razão de uma dose por grupo por um período de noventa dias. Durante o período de aplicação, os animais são observados diariamente para se detectarem manifestações de toxicidade. Os animais que morrem durante a experiência são autopsiados e no fim da experiência os animais sobreviventes são igualmente autopsiados.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Os animais são mantidos nas condições de alojamento e de alimentação da experiência, durante pelo menos cinco dias antes do teste. Antes de começar o teste os animais jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos submetidos ao tratamento e de controlo.

Pouco tempo antes de se iniciar o ensaio rapam-se os pêlos da região dorsal dos animais. Se se recorrer à tosquia esta deverá ser efectuada mais ou menos 24 horas antes do teste. Normalmente é necessário repetir estas operações todas as semanas devendo tomar-se muito cuidado para não lesar a pele.

A área destinada à aplicação da substância a testar não poderá ser inferior a 10 % da superfície corporal. O peso do animal entrará em linha de conta na decisão da zona a expôr e da dimensão da superfície a tratar. Sempre que se testam substâncias sólidas, que se necessário podem ser pulverizadas, a substância a testar deve ser humedecida com água ou com um veículo apropriado para garantir um bom contacto com a pele. As substâncias a testar líquidas são geralmente usadas sem ser diluídas. Procede-se a uma aplicação diária durante cinco a sete dias por semana.

Condições experimentais

Animais de experiência

Podem ser utilizados o rato, o coelho ou a cobaia; também podem usar-se outras espécies sendo necessário justificar o seu emprego. No início da experiência a diferença de peso entre os animais não poderá ultrapassar ± 20 % do peso médio. Se um estudo dérmico subcrónico constituir a fase preliminar de um estudo a longo prazo, deve utilizar-se a mesma espécie e estirpe em ambos os estudos.

Número e sexo

Para cada dose serão utilizados pelo menos vinte animais (dez fêmeas e dez machos) de pele sã. As fêmeas deverão ser nulíparas e não grávidas. Se for previsível sacrificar alguns animais durante a experiência devem acrescentar-se ao número inicial o número de animais que se prevê ir sacrificar. Para além destes poderá haver um grupo satélite de vinte animais (dez de cada sexo) tratado com a dose mais elevada, durante noventa diase e observado quanto à reversibilidade, à persistência ou aparecimento tardio de efeitos tóxicos durante vinte e oito dias após o tratamento.

Doses

São necessárias pelo menos três doses diferentes com um controlo ou um veículo de controlo se for usado um veículo. O período de exposição deverá no mínimo ser de seis horas por dia. A substância a testar será aplicada diariamente à mesma hora e a quantidade a administrar será ajustada regularmente (semanalmente ou bisemanalmente), de modo a manter-se constante relativamente ao peso corporal do animal. Os animais do grupo de controlo serão tratados da mesma maneira que oscanimais dos grupos de experiência com excepção da aplicação da substância a testar. Se se utilizar um veículo para facilitar a administração, este será administrado ao grupo de controlo da mesma forma que aos grupos tratados, devendo a dose corresponder à do grupo tratado com a dose mais elevada. A dose mais elevada será determinada de forma a produzir efeitos tóxicos mas nunca, ou raramente, a morte do animal; a dose mais baixa não deverá produzir quaisquer efeitos tóxicos. Se se dispuser de informação sobre a exposição humana, a dose mais baixa deverá exceder esse valor. O ideal seria a dose intermédia produzir o efeito tóxico mínimo observável.

Se se utilizarem várias doses intermédias a diferença entre elas será calculada de forma a conseguir-se uma gradação dos efeitos tóxicos. Nos grupos das doses mais baixa e intermédia a incidência de mortalidade deverá ser baixa para permitir uma avaliação significativa dos resultados.

Se a aplicação da substância a testar provocar uma grave irritação cutânea, deverão reduzir-se as concentrações, o que poderá originar uma diminuição ou até um desaparecimento dos outros efeitos tóxicos da dose mais elevada. Se as lesões cutâneas forem muito graves, pode tornar-se necessário interromper a experiência e recomeçá-la com concentrações mais fracas.

Teste limite

Se já tiver sido efectuada uma experiência preliminar com uma dose de 1 000 mg/kg ou com uma dose mais elevada em função da possibilidade de uma exposição humana conhecida, que não tenha provocado quaisquer efeitos tóxicos, será inútil prosseguir a experiência.

Período de observação

Os animais da experiência serão observados diariamente para detectar manifestações de toxicidade. Serão registados o momento da morte e o momento do aparecimento e desaparecimento das manifestações de toxicidade.

Procedimento

Os animais serão colocados em gaiolas individuais. Em condições ideais a substância a testar será administrada aos animais sete dias por semana durante um período de noventa dias.

Os animais de todos os grupos satélites que forem objecto de observações complementares serão mantidos vivos durante mais vinte e oito dias, sem tratamento, para se detectar a recuperação ou a persistência dos efeitos tóxicos. O tempo de exposição será de seis horas por dia.

A substância a testar será aplicada uniformemente numa área equivalente a 10 % da superfície total do corpo. No caso de substâncias altamente tóxicas, a superfície a utilizar poderá ser menor mas a camada da substância deverá ser o mais fina e uniforme possível.

Durante a exposição a substância a testar é mantida em contacto com a pele por meio de uma gaze porosa e de um adesivo anti-alérgico. A superfície tratada será por sua vez convenientemente coberta de maneira a manter no seu lugar a gaze e a substância a testar, e a evitar que os animais ingiram a dita substância. Podem utilizar-se aparelhos de contenção, para evitar a ingestão da substância, mas não se recomenda a imobilização completa.

No fim do tempo de exposição, se possível, é necessário eliminar todos os resíduos da substância com água ou por meio de qualquer outro método adequado de limpeza da pele.

Os animais serão observados diariamente, sendo sempre registadas as manifestações de toxicidade assim como o momento do seu aparecimento, a sua intensidade e duração. Durante o período de cativeiro observar-se-ão as modificações do pêlo e da pele, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, aparelho circulatório, do sistema nervoso autónomo e central assim como da actividade somatomotora e do comportamento. O consumo alimentar e o peso dos animais serão determinados semanalmente.

Devem observar-se regularmente os animais a fim de se evitarem perdas por canibalismo, por autólise dos tecidos ou por condições impróprias de alojamento. No fim da experiência todos os animais sobreviventes dos grupos tratados não satélites serão autopsiados. Os animais moribundos serão imediatamente retirados e autopsiados.

Os exames que a seguir se enunciam são normalmente feitos a todos os animais incluindo os controlos:

a) Um exame oftalmológico usando um oftalmoscópio ou equipamento adequado equivalente deve ser feito antes da administração da substância a testar e no fim da experiência, de preferência a todos os animais, ou pelo menos nos grupos da dose mais elevada e de controlo. Se se detectarem alterações oculares devem examinar-se todos os animais;

b) Um exame hematológico será efectuado no fim da experiência compreendendo os seguintes testes: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem de leucócitos, fórmula leucocitária bem como um estudo da coagulação e tempo de coagulação, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina, ou contagem de plaquetas;

c) A determinação de dados bioquímicos no sangue deve ser feita no fim da experiência. Apresentam um interesse geral para todos os estudos a avaliação do equilíbrio electrolítico, do metabolismo dos hidratos de carbono, da função hepática e renal. A escolha dos testes específicos será influenciada por observações relativas ao modo de acção da substância a testar. Sugere-se o doseamento do cálcio, fósforo, cloretos, sódio, potássio, glicose em jejum (o período de jejum dependerá da espécie), transaminase glutâmico-pirúvica sériea (1), transaminase glutâmico-oxaloacética sériea (2), ornitina-descarboxilase, gama-glutamil transpeptidase, azoto ureico, albumina, creatinina plasmática, bilirubina total e as proteínas séricas totais. As outras análises eventualmente necessárias a uma avaliação toxicológica adequada incluem análises de lípidos, hormonas, equilíbrio ácido-básico, methemoglobina, e actividade colinesterásica. Podem efectuar-se outras análises bioquímicas clínicas, se necessário, para aprofundar o estudo dos efeitos observados;

d) Um exame regular da urina não é necessário; este exame só é indicado em caso de efeitos tóxicos prováveis ou manifestos.

Se a informação de estudos anteriores não for apropriada deverá considerar-se a necessidade de determinação dos parámetros hematológicos e bioquímicos clínicos antes de começar a experiência.

Autópsia

Todos os animais serão submetidos a uma autópsia geral que incluirá o exame da superfície exterior do corpo, de todos os orifícios e das cavidades craniana, toráxica e abdominal e respectivos conteúdos. O fígado, os rins, as glândulas supra-renais e os testículos serão pesados, ainda húmidos, o mais rápidamente possível depois da dissecação, para se evitar a perda de líquidos por evaporação. Os seguintes orgãos e tecidos deverão ser conservados num meio adequado na eventualidade de um exame histopatológico ulterior: todas as lesões macroscópicas, encéfalo incluindo cortes da medula/protuberância, córtex cerebeloso e córtex cerebral, hipófise, tiróideia, paratiróideia, todo o tecido tímico, (traqueia), pulmões, coração, aorta, glândulas salivares, fígado, baço, rins, supra-renais, pâncreas, gônadas, útero, orgãos genitais anexos, vesícula biliar (quando presente), esófago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, cego, cólon, recto, bexiga, gânglio linfático representativo, (glândula mamária na fêmea), (musculatura da coxa), nervo periférico, (olhos), (esterno com medula óssea), (fémur, incluindo superfície articular), (medula espinhal a três níveis — cervical, mediotoráxica e lombar) e (glândulas lacrimais). Os tecidos mencionados entre parênteses só serão examinados em caso de aparecimento de sinais de toxicidade ou de compromisso do orgão alvo.

Exame histopatológico

a) Serão objecto de um exame histopatológico completo a pele normal e a pele tratada assim como os orgãos e tecidos de todos os animais de controlo e do grupo exposto à dose mais elevada;

b) Todas as lesões macroscópicas serão examinadas;

c) Os orgãos alvo dos animais pertencentes aos grupos tratados com outras doses deverão ser examinados;

d) Se se utilizarem ratos, os pulmões dos animais dos grupos expostos às doses baixa e intermédia serão submetidos a um exame histopatológico para se detectar qualquer sinal de infecção uma vez que isso nos permite uma avaliação conveniente do estado de saúde dos animais. Outros exames histopatológicos sistemáticos podem não se justificar para os animais desses grupos mas devem ser sempre efectuados aos orgãos que apresentem lesões no grupo tratado com a dose mais elevada;

c) Quando se usar um grupo satélite, será feito um exame histopatológico aos tecidos e orgãos que apresentem sinais de toxicidade nos grupos tratados.

2. RESULTADOS

Os resultados devem ser resumidos sob a forma de quadros, indicando, para cada grupo de experiência, o número de animais no início desta, o número de animais apresentando lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais apresentando cada tipo de lesão. O resultados serão avaliados por meio dum método estatístico apropriado. Pode utilizar-se qualquer método estatístico reconhecido.

(1) Conhecida actualmente por transaminase da alanina.
(2) Conhecida actualmente por transaminase do aspartato.

3. RELATÓRIO

3.1. **Relatório do teste**

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

— espécie, estirpe, origem, condições do meio ambiente, dieta,

— doses (compreendendo veículo, se utilizado) e concentrações,

— resposta tóxica por sexo e por dose,

— dose sem efeitos, se possível,

— momento de morte durante a experiência ou indicação dos animais sobreviventes no fim da experiência,

— descrição dos efeitos tóxicos ou outros,

— momento da observação de qualquer manifestação anormal e sua evolução,

— dados relativos à alimentação e peso do animal,

— observações oftalmológicas,

— exames hematológicos efectuados e seus resultados,

— testes bioquímicos clínicos utilizados e seus resultados (incluindo resultados das análises de urina),

— resultados da autópsia,

— descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas,

— tratamento estatístico dos resultados, se possível,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados,

— condições experimentais.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

TOXICIDADE SUBCRÓNICA POR INALAÇÃO:

TESTE DE NOVENTA DIAS EM ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

Vários grupos de animais de experiência são expostos diariamente, por um período determinado, a concentrações diferentes de substâncias a testar à razão de uma concentração por grupo durante um período de noventa dias. Quando se utiliza um veículo para ajudar a obter uma concentração apropriada da substância a testar na atmosfera deve usar-se um grupo controlo para o veículo. Durante o período de administração os animais são observados diariamente para se detectarem as manifestações de toxicidade. Os animais que morrem durante a experiência são autopsiados e no fim da experiência os animais sobreviventes são igualmente autopsiados.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Discrição do método de ensaio

Preparativos

Os animais são mantidos nas condições de alojamento e de alimentação da experiência pelo menos durante cinco dias antes do teste. Antes de começar o teste os animais jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos submetidos ao tratamento e de controlo. Se necessário pode adicionar-se um veículo à substância a testar para se conseguir uma concentração apropriada desta na atmosfera; se um veículo ou outros aditivos forem usados para facilitar a administração devem ser comprovadamente não tóxicos. Pode recorrer-se a dados anteriormente publicados se necessário.

Condições experimentais

Animais de experiência

Salvo contra-indicação a espécie preferida é o rato. Devem utilizar-se animais jovens e sãos de uma estirpe corrente de laboratório. No início da experiência a diferença de peso entre os animais não poderá ultrapassar ± 20 % do peso médio. Se um estudo subcrónico por inalação constituir a fase preliminar de um estudo a longo prazo, deve utilizar-se a mesma espécie e estirpe em ambos os estudos.

Número e sexo

Para cada concentração de exposição serão utilizados pelo menos vinte animais (dez fêmeas e dez machos). As fêmeas deverão ser nulíparas e não grávidas. Se for previsível sacrificar alguns animais durante a experiência devem acrescentar-se ao número inicial o número de animais que se prevê ir sacrificar. Para além destes um grupo satélite de vinte animais (dez de dada sexo) poderá ser exposto à concentração mais elevada durante noventa dias e ser observado quanto à reversibilidade, à persistência ou ao aparecimento tardio de efeitos tóxicos durante vinte e oito dias após o tratamento.

Concentração de exposição

São utilizadas pelo menos três concentrações, com um grupo controlo ou, se necessário, um grupo controlo para o veículo quando este for utilizado (correspondendo a concentração do veículo ao nível de exposição mais elevada).

Os animais do grupo de controlo são tratados da mesma forma que os dos grupos da experiência com excepção da inalação da substância a testar. A concentração mais elevada deverá produzir efeitos tóxicos mas nenhuma ou poucas mortes.

Se se dispuser de informação sobre a exposição humana a concentração mais baixa será superior a esse valor. O ideal seria a concentração intermédia produzir o efeito tóxico mínimo observável. Se se utilizarem várias concentrações intermédias a diferença entre elas será calculada de forma a conseguir-se uma gradação dos efeitos tóxicos. Nos grupos de concentração baixa e intermédia assim como nos grupos controlo, a incidência de mortalidade deverá ser baixa para permitir uma avaliação significativa dos resultados.

Tempo de exposição

A duração diária do tempo de exposição deverá ser de seis horas após se obterem as concentrações dentro da câmara de exposição. Podem utilizar-se outros tempos de exposição para satisfazer outras exigências específicas.

Equipamento

Os animais serão expostos à substância a testar por meio de um dispositivo de inalação concebido de forma a conseguir-se um fluxo de ar contínuo que assegurará pelo menos doze renovações de ar por hora e garanta uma concentração de oxigénio apropriada e uma distribuição uniforme do producto a testar no ar. Se se utilizar uma câmara esta será concebida de maneira a obter-se uma superlotação mínima dos animais e uma exposição máxima à substância a testar.

Como regra geral para se assegurar a estabilidade da atmosfera na câmara o volume total dos animais de experiência não deve ultrapassar 5 % do volume da câmara de ensaio. Pode também recorrer-se a um sistema de exposição oro-nasal, de cabeça apenas ou do corpo inteiro em câmara individual; os dois primeiros tipos de exposição permitem reduzir a penetração por outras vias.

Período de observação

Os animais da experiência deverão ser observados diariamente para se detectarem manifestações de toxicidade durante todo o período de exposição e de recuperação. Serão registados o momento da morte assim como o do aparecimento e desaparecimento das manifestações de toxicidade.

Procedimento

Os animais são expostos diariamente à substância a testar à razão de cinco a sete dias por semana, durante um período de noventa dias. Os animais dos grupos satélites destinados às observações complementares serão mantidos vivos durante mais vinte e oito dias, sem tratamento, para se detectar a recuperação ou a persistência dos efeitos tóxicos. A temperatura a que se efectua o teste deverá ser mantida a 22 ± 3 °C. Em condições óptimas, a humidade relativa deverá ser mantida entre 30 e 70 % mas, nalguns casos, isto pode ser impraticável (por exemplo, testes com aerosol). Durante a exposição, os animais não receberão alimentos nem água. Deverá ser usado um sistema de inalação dinâmico com um dispositivo apropriado de controlo analítico da concentração. Recomenda-se a realização de um teste preliminar para se determinarem as concentrações apropriadas de exposição. O débito de ar deverá assegurar concentrações homogéneas em toda a câmara de exposição. O sistema deverá permitir a obtenção de condições estáveis o mais rapidamente possível.

Deverá ser feita a medição ou monitorização de:

a) Débito de ar (permanentemente);

b) A concentração real da substância a testar medida na zona de respiração. Durante o período de exposição diária a concentração não variará além de ± 15 % do valor médio. Contudo no caso de poeiras e aerossois esta precisão pode não ser possível e uma variação maior poderá então ser aceitável. Durante toda a duração da experiência, as concentrações diárias serão mantidas o mais constantes possível. Durante a elaboração do sistema gerador proceder-se-á a uma análise granulométrica das partículas para determinar a estabilidade das concentrações do aerosol. Durante a exposição far-se-ão análises o mais frequentemente possível para determinação da estabilidade da repartição granulométrica;

c) Temperatura e humidade;

d) Durante e após a exposição às concentrações são feitas observações e registadas sistematicamente; são feitas fichas individuais para cada animal. Todos os animais serão observados diariamente e as manifestações de toxicidade assim como o momento do seu aparecimento, a sua intensidade e a sua duração serão registados;

Durante o período de cativeiro é conveniente observar nomeadamente, as modificações da pele e do pêlo, dos olhos, das mucosas, do aparelho respiratório, do aparelho circulatório, do sistema nervoso autónomo e central, da actividade somatomotora e do comportamento. O consumo alimentar e o peso dos animais serão determinados todas as semanas. É necessário observar regularmente os animais a fim de se assegurar que não há perdas por canibalismo, autólise dos tecidos ou condições impróprias de alojamento. No fim da experiência, todos os animais sobreviventes são autopsiados. Durante a experiência, os animais moribundos serão imediatamente retirados e autopsiados.

Os exames que a seguir se enunciam são normalmente feitos a todos os animais, incluindo os de controlo:

a) Um exame oftalmológico usando um oftalmoscópio ou equipamento adequado equivalente deve ser feito antes da exposição à substância a testar e no fim da experiência de preferência a todos os animais ou pelo menos nos grupos da dose mais elevada e de controlo. Se se detectarem alterações oculares devem examinar-se todos os animais;

b) Um exame hematológico será efectuado no fim da experiência compreendendo os seguintes testes: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem de leucócitos, fórmula leucocitária, bem como um estudo da coagulação pelo tempo de coagulação, tempo de protombina, tempo de tromboplastina ou contagem de plaquetas;

c) A determinação de dados bioquímicos no sangue deve ser feita no fim da experiência. Apresentam um interesse geral para todos os estudos a avaliação do equilíbrio electrolítico, do metabolismo dos hidratos de carbono, da função hepática e renal. A escolha dos testes específicos será influenciada por observações relativas ao modo de acção da substância a testar. Sugere-se o doseamento do cálcio, fósforo, cloretos, sódio, potássio, glicose em jejum (o período de jejum dependerá da espécie), transaminase glutâmico-pirúvica séria (1), transaminase glutâmico-oxaloacética séria (2), ornitina-descarboxilase, gama-glutamil transpeptidase, azoto ureico, albumina, creatinina plasmática, bilirubina total e as proteínas séricas totais. As outras análises eventualmente necessárias a uma avaliação toxicológica adequada incluem análises de lípidos, hormonas, equilíbrio ácido-básico, methemoglobina e actividade colinesterásica. Podem efectuar-se outras análises bioquímicas clínicas, se necessário, para aprofundar o estudo dos efeitos observados;

d) Um exame regular da urina não é necessário; este exame só é indicado em caso de efeitos tóxicos prováveis ou manifestos.

Se a informação de estudos anteriores não for apropriada deverá considerar-se a necessidade de determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos clínicos antes de começar a experiência.

Autópsia

Todos os animais são submetidos a uma autópsia geral que incluirá o exame da superfície exterior do corpo, de todos os orifícios e das cavidades cranianas, toráxicas e abdominal e respectivos conteúdos. O fígado, os rins, as glândulas supra-renais e os testículos serão pesados, ainda húmidos, o mais rápidamente possível depois da dissecação para evitar a perda de líquidos por evaporação. Os seguintes orgãos e tecidos deverão ser conservados num meio adequado na eventualidade de exames histopatológicos ulteriores: todas as lesões macroscópicas, pulmões — que devem ser retirados inteiros, pesados e tratados com um fixador apropriado que permita conservar a estrutura pulmonar (considera-se a perfusão com o fixador como um método eficaz), tecidos da naso-faringe, encéfalo — incluindo cortes da medula/da protuberância, córtex cerebeloso e córtex cerebral, hipófise, tiróideia/paratiróideia, todo o tecido tímico, traqueia, pulmões, coração, aorta, glândulas salivares, fígado, baço, rins glândulas supra-renais, pâncreas, gónadas, útero, (orgãos genitais anexos), (pele), vesícula biliar (quando presente), esófago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, cego, cólon, recto, bexiga, gânglio linfático representativo (glândula mamária na fêmea), (musculatura da coxa), nervo periférico, (olhos), esterno com medula óssea, (fémur, incluindo superfície articular), (medula espinhal a três níveis — cervical, mediotorácica e lombar). Os tecidos mencionados entre parentesis só serão observados em caso de aparecimento de sinais de toxicidade ou de compromisso do orgão alvo.

Exame histopatológico

a) Serão objecto de um exame histopatológico completo as vias respiratórias, assim como os orgãos e tecidos de todos os animais do grupo de controlo e dos do grupo exposto à dose mais elevada;

b) Todas as lesões macroscópicas serão examinadas;

c) Os orgãos alvo dos animais pertencentes a outros grupos tratados serão examinados;

d) Os pulmões dos animais pertencentes aos grupos expostos às doses baixa e intermédia serão submetidos a um exame histopatológico, uma vez que isto nos permite uma avaliação conveniente do estado de saúde dos animais. Outros exames histopatológicos sistemáticos podem não se justificar para os animais desses grupos mas devem ser sempre efectuados aos orgãos que apresentem lesões no grupo tratado com a dose mais elevada;

e) Qando se usa um grupo satélite, será praticado um exame histopatológico aos tecidos e orgãos que apresentem sinais de toxicidade nos grupos tratados.

(1) Conhecida actualmente por transaminase da alanina.
(2) Conhecida actualmente por transaminase do aspartato.

2. **RESULTADOS**

Os resultados serão resumidos sob a forma de quadros indicando, para cada grupo de teste o número de animais no início, o número de animais atingidos por lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais apresentando cada tipo de lesão. O resultados serão avaliados com um método estatístico apropriado. Pode ser utilizado qualquer método estatístico reconhecido.

3. **RELATÓRIO**

3.1. *Relatório do teste*

O relatório do teste deve incluir as seguintes informações:

— espécie, estirpe, origem, condições do meio ambiente, dieta,

— condições experimentais:

Descrição do aparelho de exposição: incluindo concepção, tipo, dimensões, fonte de ar, sistema gerador de partículas e de aerossóis, método de condicionamento de ar, tratamento do ar evacuado e, no caso disso, o método de acondicionamento dos animais na câmara de ensaio. O equipamento utilizado para medir a temperatura, a humidade, e se necessário, a estabilidade das concentrações do aerossol ou da granulometria das partículas será descrito.

Dados relativos à exposição: Estes dados serão apresentados sob a forma de um quadro indicando os valores médios assim como uma medida de variação (por exemplo: desvio-padrão) e dirão respeito:

a) Aos débitos de ar através do dispositivo de inalação;

b) À temperatura e à humidade do ar;

c) À concentrações nominais (quantidade total da substância a testar introduzida no dispositivo de inalação dividida pelo volume de ar);

d) À natureza do veículo se utilizado;

e) Às concentrações reais na zona de respiração;

f) Às dimensões médias das partículas, se necessário,

— resposta tóxica por seco e por concentração,

— dose sem efeito, se possível,

— momento da morte durante a experiência ou indicação dos animais sobreviventes,

— descrição dos efeitos tóxicos ou outros,

— momento de observação de qualquer manifestação anormal e sua evolução,

— dados relativos à alimentação e peso corporal,

— observações oftalmológicas,

— exames hematológicos efectuados e seus resultados,

— testes bioquímicos clínicos utilizados e seus resultados (incluindo análises de urina),

— resultados da autópsia,

— descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas,

— tratamento estatístico dos resultados, se apropriado,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

TESTE DE TERATOGÉNESE:

ROEDORES E NÃO ROEDORES

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método do ensaio

A substância a testar é administrada em diferentes doses ou concentrações a vários grupos de fêmeas grávidas, pelo menos durante a parte da gestação correspondendo à organogénese, à razão de uma dose por grupo. Pouco tempo antes da data esperada do parto a fêmea é sacrificada, removendo-se o útero e examinando-se o seu conteúdo. Este método de ensaio explora a embriotoxicidade e a toxicidade fetal.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Aclimatizam-se às condições de experiência fêmeas adultas jovens e sãs, nunca tendo acasalado, de idade e tamanhos comparáveis, durante pelo menos cinco dias antes da experiência e depois acasaladas com machos de fecundidade comprovada. As femas inseminades são repartidas ao acaso entre os grupos tratados.

A fecundação pode ser feita naturalmente ou por inseminação artificial. A substância a testar é administrada diariamente às fêmeas imediatamente após a implantação e durante todo o período de organogénese. Um dia antes do termo, retiram-se os fetos por histerectomia e examinam-se as alterações viscerais ou do esqueleto, incluindo atrasos de crescimento, ossificação tardia e hemorragias intestinais.

Condições experimentais

Animais de experiência

As espécies habitualmente utilizadas são o rato, o ratinho o hamster e o coelho com preferência para o rato e o coelho. Deverão ser utilizadas as estirpes correntes de laboratório. A estirpe utilizada deverá ter uma fecundidade suficiente e será caracterizada pela sua reacção aos agentes teratogénicos. Os animais deverão ser colocados em gaiolas individuais.

Número e sexo

Serão necessários para cada dose pelo menos vinte ratas, ratinhas ou hamsters grávidas ou doze coelhas grávidas. O objectivo é assegurar um número de ninhadas e de crias suficiente para avaliar o potencial teratogénico da substância.

Doses

Serão utilizadas pelo menos três doses diferentes bem como um grupo de controlo. Se a substância a testar for administrada num veículo, deve utilizar-se igualmente um grupo de controlo para o veículo. As propriedades toxicológicas do veículo devem ser conhecidas: não deve existir nenhum efeito teratogénico ou sobre a reprodução. Com excepção da substância a testar, o tratamento do(s) grupo(s) de controlo será idêntico ao dos grupos de

experiência. A menos que a natureza físico/química ou as propriedades biológicas da substância a isso se oponham, a dose mais elevada deverá pôr em evidência, nas condições ideais, uma certa toxicidade nas mães, por exemplo uma ligeira diminuição de peso, mas não deverá provocar a morte de mais de 10 %. A dose mais baixa não deverá produzir efeitos observáveis atribuíveis à substância a testar. A(s) dose(s) intermédia(s) deverão situar-se geometricamente entre as doses mais elevada e mais baixa.

Teste limite

No caso de substâncias pouco tóxicas se uma dose de pelo menos 1 000 mg/kg não produzir qualquer efeito tóxico no embrião ou qualquer efeito teratogénico pode considerar-se inútil prosseguir a experiência com outras doses. Se uma dose de menos 1 000 mg/kg evidenciar alguma toxicidade na mãe (como especificado a seguir) mas não tiver nenhum efeito nocivo no embrião, pode considerar-se inútil prosseguir a experiência com outras doses.

Tempo de exposição

O dia 0 é aquele em que se observa a presença dum rolhão vaginal ou de esperma (quando possível). O tratamento deverá cobrir o período da organogénese, ou seja seis a quinze dias para o rato e o ratinho, seis a catorze dias para hamster e seis a dezoito dias para o coelho. Se o dia 0 for o de acasalamento ou de inseminação artificial, acrescentar-se-á um dia a cada um dos períodos mencionados. O período de tratamento pode também ser prolongado até cerca de um dia antes da data presumível do parto.

Período de observação

Será efectuado um exame clínico atento pelo menos uma vez por dia. Serão efectuados exames complementares diariamente tomando-se medidas apropriadas a fim de reduzir a perda de animais do estudo.

Procedimento

A substância a testar é administrada oralmente por *gavage*. Deverá ser administrada sempre à mesma hora todos os dias durante toda a duração do tratamento.

A dose pode ser calculada em função do peso das fêmeas no início do tratamento ou, tendo em conta o rápido aumento de peso durante a gestação, podem ser pesadas periodicamente, adaptando-se a dose ao seu último peso. As manifestações de toxicidade serão registadas à medida que forem surgindo, com indicação da sua intensidade e da sua duração. As fêmeas com sinais de aborto ou de parto prematuro serão sacrificadas e submetidas a um exame macroscópico completo. O período de observação pós-tratamento será prosseguido até cerca de um dia antes do termo. O objectivo é cobrir a maior parte do período de gestação mas evitar as dificuldades duma interpretação dos dados no caso de partos naturais. Durante o período de cativeiro deverão observar-se entre outras as modificações do pêlo e da pele, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do aparelho circulatório, do sistema nervoso autónomo e central, bem como a actividade somato-motora e do comportamento. Deverão determinar-se semanalmente o consumo alimentar bem como o peso dos animais.

Autópsia

No momento da morte, seja no decurso do estudo ou no fim deste, os animais serão objecto dum exame macroscópico a fim de procurar qualquer anomalia estrutural ou quaisquer modificações patológicas susceptíveis de ter influenciado a gestação. Imediatamente após a morte o útero será retirado e o seu conteúdo examinado a fim de revelar o número de embriões ou de fetos mortos bem como o número de fetos vivos. Habitualmente é possível determinar o momento da morte *in utero*. O número de corpos amarelos pode ser determinado nos ratos e nos coelhos. Serão determinados o sexo e o peso de cada feto; os pesos serão anotados e calculado o peso médio. Depois da extracção cada feto será objecto dum exame exterior. No caso dos ratos, dos ratinhos e dos hamsters, 33 a 50 % dos animais de cada ninhada serão processados e examinados do ponto de vista de anomalias do esqueleto, sendo os restantes processados e examinados para se procurar anomalias das partes moles, usando métodos apropriados. No caso dos coelhos, cada feto será dissecado cuidadosamente para se detectar alterações das vísceras sendo em seguida examinado do ponto de vista de alterações do esqueleto.

2. **RESULTADOS**

Os dados serão resumidos sob a forma de quadros, indicando para cada grupo da experiência, o número de animais no início do ensaio, o número de fêmeas grávidas, o número e a percentagem de fetos vivos e de fetos apresentando alterações das partes moles ou do esqueleto bem como a sua relação com ninhadas específicas. Os resultados serão avaliados por meio dum método estatístico apropriado. Pode utilizar-se qualquer método estatístico reconhecido.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório deverá incluir as informações seguintes:

— espécie, estirpe, origem, condições do ambiente, dieta,

— condições experimentais,

— doses (incluindo o veículo, se utilizado) e concentração,

— resposta tóxica por dose,

— dose sem efeitos (se possível),

— momento da morte no decurso da experiência ou indicação dos animais sobreviventes no fim da experiência,

— descrição dos efeitos tóxicos ou outros,

— momento da observação de todas as manifestações anormais e sua evolução,

— dados relativos à alimentação e peso corporal,

— duração da gestação e informações sobre as ninhadas (incluindo dados publicados anteriormente),

— dados relativos ao feto (vivo/morto, sexo, alterações das partes moles e do esqueleto),

— dados sobre a ninhada (vivo/morto, sexo, alterações das partes moles e esqueleto para cada ninhada),

— tratamento estatístico dos resultados,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

TESTE DE TOXICIDADE CRÓNICA

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

A substância a testar é administrada normalmente sete dias por semana, pela via apropriada a vários grupos de animais de experiência à razão de uma dose por cada grupo durante a maior parte da sua vida. Durante e depois da exposição à substância a testar observam-se diariamente os animais de experiência para se detectar manifestações de toxicidade.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Os animais são mantidos nas condições de alojamento e de alimentação da experiência, durante pelos menos cinco dias antes do teste. Antes da começar o teste os animais jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos submetidos ao tratamento e de controlo.

Condições experimentais

Animais de experiência

A espécie preferida é o rato. Podem utilizar-se outras espécies (roedores ou não roedores) de acordo com os resultados de estudos anteriores. Devem utilizar-se animais jovens e sãos de estirpes correntes de laboratório, e o tratamento deve começar o mais cedo possível após o desmame.

No início da experiência a diferença de peso entre os animais não deverá ultrapassar ± 20 % do peso médio. Se um estudo subcrónico oral tiver constituído a fase preliminar de um estudo a longo prazo deve utilizar-se a mesma espécie e estirpe em ambos os estudos.

Número e sexo

No caso de roedores serão utilizados pelo menos quarenta animais (vinte fêmeas e vinte machos) para cada dose e grupo de controlo correspondente. As fêmeas deverão ser nulíparas e não grávidas. Se estiver previsto o sacrifício de animais no decurso da experiência, os efectivos devem ser aumentados do número de animais cujo sacrifício estiver previsto. Para os não roedores aceita-se um número mais pequeno de animais, pelo menos quatro por sexo e por grupo.

Doses e frequência de exposição

Devem utilizar-se pelo menos três doses além do grupo de controlo correspondente. A dose máxima deverá produzir manifestações nítidas de toxicidade sem causar mortalidade excessiva. A dose mais baixa não produzirá nenhum efeito tóxico.

A(s) dose(s) intermédia(s) terá (terão) um valor próximo da média entre a dose máxima e a dose mínima.

Os níveis de dose deverão ter em conta os dados obtidos nos ensaios e estudos de toxicidade efectuados anteriormente.

Normalmente a frequência de exposição será diária. Se o produto químico for administrado na água de beber ou incorporado na alimentação deve estar constantemente disponível.

Controlos

Deverá utilizar-se um grupo de controlo idêntico em todos os aspectos aos grupos tratados com excepção da exposição à substância a testar.

Em condições especiais como em estudos por inalação implicando o emprego de aerossóis ou o uso de um emulsionante com actividade biológica não estudada em ensaios por via oral, deverá utilizar-se um grupo suplementar de controlo negativo correspondente. O grupo de controlo negativo é tratado da mesma maneira que os outros grupos com excepção da exposição à substância a testar ou a qualquer veículo.

Via de administração

As duas vias principais de administração são a oral e a respiratória (por inalação). A escolha da via de administração depende das características físico-químicas da substância a testar e da via mais provável de exposição humana.

A utilização da via cutânea coloca problemas práticos consideráveis. A toxicidade crónica sistémica provocada pela absorção percutânea pode normalmente deduzir-se dos resultados de outros testes orais, e do conhecimento da quantidade de substância absorvida por via percutânea em estudos anteriores de toxicidade por essa via.

Estudos por via oral

A via oral de administração é preferida, salvo contra-indicações, se a substância a testar for absorvida pelo tubo digestivo e se a ingestão for uma via possível de exposição humana.

Os animais podem receber a substância a testar na alimentação, dissolvida na água de beber, ou numa cápsula. Em condições ideais a dose diária será administrada sete dias por semana visto que a administração em cinco dias por cada sete pode permitir a recuperação do animal ou a diminuição de toxicidade no período em que o tratamento é interrompido e assim afectar os resultados e a avaliação subsequente. No entanto, por razões essencialmente práticas, a administração em cinco dias por cada sete é considerada aceitável.

Estudos por inalação

Um vez que os estudos por inalação colocam problemas técnicos de maior complexidade do que os por outras vias de administração, são dadas aqui recomendações mais pormenorizadas. Deve notar-se que a instilação endotraqueal pode constituir uma alternativa válida em certas situações específicas.

As exposições prolongadas (de longo prazo) são habitualmente calculadas em função da exposição humana prevista: os animais são expostos cinco dias por semana (exposição intermitente) à razão de seis horas por dia depois de se obterem as concentrações na câmara de experiência ou expostos sete dias em cada sete (exposição contínua) à razão de 22 a 24 horas por dia destinando-se uma hora por dia à alimentação dos animais segundo um horário regular e à manutenção das câmaras. Em ambos os casos os animais são habitualmente expostos a uma concentração fixa da substância a testar.

Uma diferença essencial entre a exposição intermitente e a exposição contínua reside no facto de na primeira os animais disporem dum período de 17 a 18 horas para recuperar dos efeitos da exposição diária e mesmo de um período mais longo durante os fins-de-semana. A escolha da exposição intermitente ou contínua será feita em função dos objectivos do estudo e da exposição humana que deve ser simulada. Convém no entanto ter em conta certas dificuldades técnicas: por exemplo as vantagens da exposição contínua na simulação das condições do ambiente podem ser contrariadas pela necessidade de alimentar e dar de beber aos animais durante a exposição e ainda pela necessidade de técnicas mais complicadas de produção de aerossóis e de vapores bem como de monitorização.

Câmaras de exposição

Os animais são expostos à substância a testar em câmaras de inalação concebidas de forma a conseguir-se um fluxo de ar dinâmico de pelo menos doze renovações de ar por hora e uma concentração adequada de oxigénio e uma distribuição uniforme da substância a testar no ar. As câmaras de exposição e as câmaras de controlo serão idênticas quanto à construção e concepção a fim de garantirem condições de exposição comparáveis em todos os aspectos, com excepção da exposição à substância a testar. Geralmente mantém-se uma ligeira pressão negativa no interior da câmara para impedir fugas da substância a testar para a área envolvente. As câmaras deverão ser concebidas de forma a evitar a superlotação com os animais de experiência.

Em geral para assegurar a estabilidade da atmosfera da câmara, o volume total dos animais de experiência não deve ultrapassar 5 % do volume da câmara de exposição.

Deverá ser feita a medição ou monitorização de:

i) Débito do ar: o débito do ar na câmara deverá de preferência ser monitorizado continuamente;

ii) Concentração: durante o período de exposição diária a concentração da substância a testar não deve variar mais que ± 15 % em redor do valor médio;

iii) Temperatura e humidade: para roedores a temperatura deve ser mantida a 22 °C (± 2 ° C) e a humidade dentro da câmara será de 30 a 70 % excepto quando se utilizar água para colocar em suspensão na atmosfera das câmaras a substância a testar. Estes parâmetros serão, de preferência, monitorizados permanentemente;

iv) Análise granulométrica das partículas: deverá efectuar-se uma determinação da distribuição granulométrica das partículas nas atmosferas das câmaras onde se utilizam aerossóis líquidos ou sólidos. As partículas do aerosol deverão ter um diâmetro respirável para o animal de experiência utilizado. Serão retiradas amostras das atmosferas das câmaras de ensaio, na zona de respiração dos animais. A amostra de ar retirada deverá ser representativa da distribuição das partículas a que os animais são expostos e representará, numa base gravimétrica, o conjunto do aerosol em suspensão, mesmo se uma grande parte deste não for inalável. As análises granulométricas serão feitas frequentemente durante a elaboração do sistema gerador para assegurar a estabilidade do aerosol, sendo depois feitas tantas vezes quanto as necessárias durante as exposições para determinar de forma adequada a estabilidade das distribuições das partículas a que os animais forem expostos.

Duração do estudo

O período de administração deverá ser pelo menos de doze meses.

Procedimento

Observações

Deverá proceder-se pelo menos uma vez por dia a um exame clínico atento. Observações complementares deverão ser feitas diariamente e tomar-se medidas apropriadas para diminuir a perda de animais do estudo, por exemplo autópsia, ou refrigeração dos animais encontrados mortos e isolamento ou sacrifício dos animais de saúde precária. Os animais serão observados cuidadosamente para se detectar o aparecimento ou desaparecimento de sinais de toxicidade assim como para reduzir a perda de animais por doença, autólise dos tecidos ou canibalismo.

Os sinais clínicos incluindo as modificações neurológicas e oculares assim como a mortalidade serão registados relativamente a todos os animais. Será registado o momento do aparecimento de efeitos tóxicos e a sua evolução assim como os tumores suspeitos.

O peso de cada animal será determinado e registado uma vez por semana durante as teze primeiras semanas do período de ensaio e posteriormente pelo menos uma vez de quatro em quatro semanas. O consumo alimentar será determinado todas as semanas durante as treze primeiras semanas do estudo e posteriormente de três em três meses a menos que o estado de saúde ou as modificações do peso corporal dos animais justifiquem outra frequência.

Exame hematológico

Deverá efectuar-se um exame hematológico (por exemplo: concentração de hemoglobina, hematócrito, número total de leucócitos, plaquetas ou outros testes de coagulação) aos três meses, aos seis meses e em seguida a intervalos de seis meses e no fim da experiência, em amostras de sangue recolhidas de todos os não roedores e de dez ratos/sexo de cada grupo. Se possível as amostras deveriam ser colhidas de cada vez nos mesmos ratos. Além disso, deve colher-se uma amostra de sangue antes do teste, aos não roedores.

Se as observações clínicas sugerirem uma deterioração do estado de saúde de alguns dos animais durante o estudo, deverá obter-se uma fórmula leucocitária dos animais afectados. Deverá obter-se uma fórmula leucocitária em amostras de sangue dos animais do grupo tratado com a dose mais elevada e dos controlos. Serão obtidas fórmulas no(s) grupo(s) tratados com dose mais baixa apenas no caso de se verificar uma grande discrepância entre o grupo tratado com a dose mais elevada e os controlos, ou se indicados pelos achados patológicos.

Análise de urina

Serão colhidas as amostras de urina para análise a todos os não roedores assim como em dez ratos/sexo de todos os grupos, se possível sempre aos mesmos ratos e na mesma altura dos exames histopatológicos. Deverão ser efectuadas as seguintes determinações em cada animal individualmente ou, no caso dos roedores, num *pool* de urina do mesmo grupo e do mesmo sexo:

— aspecto: volume e densidade para os animais tomados individualmente,

— proteínas, glicose, corpos cetónicos, sangue oculto (semi-quantitativamente),

— microscopia do sedimento urinário (semi-quantitativamente).

Bioquímica clínica

De seis em seis meses e no fim do estudo colher-se-ão amostras de sangue para determinações bioquímicas clínicas de todos os não roedores e a dez ratos/sexo de todos os grupos, e se possível, sempre dos mesmos ratos de cada vez. Além disso, será recolhida uma amostra pré-teste dos não roedores. O plasma preparado a partir destas amostras será utilizado para as seguintes determinações:

— concentração de proteínas totais,

— concentração de albumina,

— testes de função hepática (tais como a actividade da fosfatase alcalina, actividades da transaminase glutâmico — pirúvica [1] e da glutâmico-oxaloacética [2], gama-glutamil transpeptidase, ornitina descarboxilase,

— metabolismo dos hidratos de carbono como uma glicémia em jejum,

— testes da função renal como a ureia sanguínea.

Autópsia

Todos os animais serão submetidos a uma autópsia geral, incluindo os que morrem no decurso da experiência ou que tenham sido sacrificados por se encontrarem moribundos. Antes do sacrifício deverão colher-se amostras de sangue de todos os animais para se fazerem fórmulas leucocitárias. Deverão ser considerados todos os tumores ou lesões nitidamente visíveis e as lesões suspeitas de serem tumores. Tentar-se-á estabelecer correlações entre os achados macroscópicos e as observações microscópicas.

Deverão ser conservados todos os orgãos e tecidos para um exame histopatológico. Este procedimento inclui habitualmente os seguintes orgãos e tecidos: encéfalo [3] (medula/protuberância, córtex cerebeloso, córtex cerebral) hipófise, tiroideia (incluindo paratiroideias), timo, pulmões (incluindo traqueia), coração, aorta, glândulas salivares, fígado [3], baço, rins [3], supra-renais [3], esófago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, cego, cólon, recto, bexiga, gânglios linfáticos, pâncreas, gónadas [3], orgãos genitais anexos, glândula mamária na fêmea, pele, musculatura, nervo periférico, medula espinhal (cervical, torácica, lombar), esterno com medula óssea, e fémur (incluindo articulação) e olhos. A insuflação dos pulmões e bexiga com um fixador é o meio óptimo para preservar estes tecidos; a insuflação dos pulmões nos estudos de inalação é essencial para um exame histopatológico apropriado. Em estudos especiais como os de inalação deve ser estudado todo o sistema respiratório, incluindo o nariz, faringe e laringe.

Se se fizerem outros exames clínicos, a informação obtida deverá estar disponível antes do exame microscópico, uma vez que pode fornecer indicações preciosas ao patologista.

Histopatologia

Deverão ser examinadas microscopicamente todas as alterações visíveis, em particular tumores e outras lesões ocorrendo em qualquer orgão. Além disso são recomendados os seguintes procedimentos:

a) Exame microscópico de todos os orgãos e tecidos, com uma descrição completa de todas as lesões encontradas em:
   1. Todos os animais que morrerem ou forem sacrificados durante o estudo,
   2. Todos os animais do grupo de dose mais elevado e controlos;

b) Os orgãos e tecidos apresentando alterações causadas ou possivelmente causadas pela substância testada são também examinados nos grupos de dose mais baixa;

c) Quando os resultados do teste indicarem uma redução substancial da duração normal da vida dos animais ou uma indução de efeitos que possam afectar a resposta tóxica, dever-se-á examinar os animais do grupo da dose imediatamente inferior, do modo descrito acima;

d) Informações sobre a incidência de lesões ocorrendo normalmente na estirpe de animais utilizados, nas mesmas condições laboratoriais, isto é, dados de experiências anteriores acerca dos controlos, são indispensáveis para uma avaliação correcta da significância das alterações observadas nos animais tratados.

(1) Actualmente designada transaminase da alanina.
(2) Actualmente designada transaminase do aspartato.
(3) Estes orgãos, provenientes de dez animais por sexo e por grupo no caso dos roedores deverão ser pesados.

2. RESULTADOS

Os resultados deverão ser resumidos em quadros, indicando, para cada grupo de experiência o número de animais no início do teste, o número de animais apresentando lesões e a percentagem de animais apresentando cada tipo de lesões. Os resultados deverão ser avaliados com um método estatístico apropriado.

3. RELATÓRIO

3.1. **Relatório do teste**

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

— espécie, estirpe, origem, condições do ambiente, dieta,

— condições esperimentais:

Descrição do dispositivo de exposição:

incluindo concepção, tipo, dimensões, fonte de ar, sistema gerador de partículas e aerossóis, método de acondicionamento dos animais na câmara de exposição, quando utilizada. Deverá ser descrito o equipamento utilizado para a medição da temperatura, da humidade e, se necessário, da estabilidade da concentração ou a granulometria das partículas.

Dados relativos à experiência

Estes deverão ser apresentados em forma de quadros indicando as médias e uma medida da variação (por exemplo: o desvio-padrão) e deverão incluir:

a) Os débitos do ar através do dispositivo de inalação;

b) A temperatura e a humidade do ar;

c) As concentrações nominais (quantidade total da substância a testar introduzida no dispositivo de inalação dividida pelo volume do ar);

d) Natureza do veículo, se utilizado;

e) Concentrações na zona de respiração;

f) Dimensões médias das partículas (se necessário),

— doses (incluindo veículo, se utilizado) e concentrações,

— resposta tóxica, por sexo e por dose,

— dose sem efeitos, se possível,

— momento da morte durante o estudo ou indicação dos animais sobreviventes,

— descrição dos efeitos tóxicos e outros,

— momento de observação das manifestações anormais e sua evolução subsequente,

— observações oftalmológicas,

— dados relativos à alimentação e peso corporal,

— testes hematológicos utilizados e todos os seus resultados,

— testes bioquímicos clínicos empregados e todos os resultados (incluindo todas as análises de urina),

— resultados da autópsia,

— descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas,

— tratamento estatístico dos resultados se possível,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

TESTE DE CARCINOGÉNESE

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método do ensaio

A substância a testar é administrada normalmente sete dias por semana, pela via apropriada, a vários grupos de animais de experiência à razão duma dose por cada grupo durante a maior parte da sua vida. Durante e depois da exposição à substância a testar observa-se diariamente os animais de experiência, para se detectarem sinais de toxicidade, em especial a formação de tumores.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Os animais são mantidos nas condições de alojamento e alimentação da experiência durante pelo menos cinco dias antes do teste. Antes de começar o teste os animais jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos submetidos ao tratamento e de controlo.

Animais de experiência

A espécie preferida é o rato. Podem utilizar-se outras espécies(roedores ou não roedores) de acordo com resultados de estudos anteriores. Devem utilizar-se animais jovens e sãos de estirpes correntes de laboratório e o tratamento deve começar o mais cedo possível após o desmame. No início da experiência a diferença de peso entre os animais não deverá ultrapassar ± 20 % do peso médio. Se um estudo de toxicidade subcrónica oral tiver constituído a fase preliminar de um estudo a longo prazo deve utilizar-se a mesma espécie e estirpe em ambos os estudos.

Número e sexo

No caso de roedores serão utilizados pelo menos cem animais (cinquenta machos e cinquenta fêmeas) para cada dose e grupo de controlo correspondente. As fêmeas serão nulíparas e não grávidas. Se estiver previsto o sacrifício de animais no decurso da experiência, os efectivos devem ser aumentados do número dos animais cujo sacrifício estiver previsto.

Doses e frequência de exposição

Devem utilizar-se pelo menos três doses além do grupo de contolo correspondente. A dose máxima deverá provocar sinais mínimos de toxicidade tais como um pequeno abrandamento da progressão do peso corporal (menos de 10 %), sem alterar substancialmente a duração normal de vida devido a efeitos diferentes de tumores.

A dose mais baixa não deverá alterar o crescimento normal, desenvolvimento e longevidade dos animais, ou produzir qualquer manifestação de toxicidade.

A(s) dose(s) intermédia(s) terá (terão)um valor próximo da média entre a dose máxima e a dose mínima.

Os níveis de dose deverão ter em conta os dados obtidos nos ensaios e estudos de toxicidade efectuados anteriormente.

Normalmente a frequência de exposição será diária. Se a substância a testar for administrada na água de beber ou incorporada na alimentação, deve estar constantemente disponível.

Controlos

Deverá utilizar-se um grupo de controlo idêntico em todos os aspectos aos grupos de tratamento com excepção da exposição à substância a testar.

Em condições especiais, como em estudos por inalação implicando o emprego de aerossóis ou o uso de um emulsionante com actividade biológica não estudada em ensaios por via oral, deverá utilizar-se um grupo suplementar de controlo não exposto ao veículo.

Via de administração

As três principais vias de administração são a oral, cutânea e inalatória. A escolha da via de administração depende das características físico-químicas da substância a testar e da via mais provável de exposição humana.

Estudos por via oral

A via oral de administração é preferida, salvo contra-indicações, se a substância a testar for absorvida pelo tubo digestivo e se a ingestão for uma via possível de exposição humana. Os animais podem receber a substância a testar na dieta, dissolvida na águna de beber ou sob a forma de cápsulas.

Em condições ideais, a dose diária será administrada sete dias por cada sete visto que a administração em cinco dias por cada sete pode permitir a recuperação do animal ou a diminuição da toxicidade no período em que o tratamento é interrompido e assim afectar os resultados e a avaliação subsequente. No entanto, por razões essencialmente práticas a administração em cinco dias por sete é considerado aceitável.

Estudos por via cutânea

A exposição cutânea por aplicação com pincel pode ser escolhida para simular uma via principal de exposição humana e também como um modelo experimental para a indução de lesões cutâneas.

Estudos por inalação

Uma vez que os estudos de inalação colocam problemas técnicos de maior complexidade que os por outras vias de administração, são dadas aqui recomendações mais pormenorizadas. Deve notar-se que a instilação endotraqueal pode constituir uma alternativa válida em certas situações específicas.

As exposições prolongadas (de longo prazo) são habitualmente calculadas em função da exposição humana prevista: os animais são expostos cinco dias em cada sete (exposição intermitente) à razão de seis horas por dia depois de se obterem as concentrações na câmara de experiência ou expostos sete dias em cada sete (exposição contínua) à razão de 22 a 24 horas por dia, destinando-se uma hora por dia à alimentação dos animais segundo horário regular e à manutenção das câmaras. Em ambos os casos os animais são habitualmente expostos a uma concentração fixa da substância a testar.

Uma diferença essencial entre a exposição intermitente e a exposição contínua reside no facto de na primeira os animais disporem dum período de 17 a 18 horas para recuperar dos efeitos da exposição diária e mesmo dum período mais longo durante os fins-de-semana. A escolha entre a exposição intermitente ou contínua será feita em função dos objectivos do estudo e da exposição humana que deve ser simulada. Convém no entanto ter em conta certas dificuldades técnicas: por exemplo as vantagens da exposição contínua na simulação das condições do ambiente podem ser contrariadas pela necessidade de alimentar e dar de beber aos animais e ainda pela necessidade de técnicas mais complicadas de produção de aerossóis e de vapores bem como de monitorização.

Câmaras de exposição

Os animais serão expostos à substância a testar em câmaras de inalação concebidas de forma a conseguir-se um fluxo de ar dinâmico de pelo menos doze renovações de ar por hora, uma concentração de oxigénio adequada e uma distribuição uniforme da substância a testar no ar. As câmaras de exposição e as câmaras de controlo serão idênticas quanto à construção e concepção a fim de garantirem condições de exposição comparáveis em todos os aspectos, com excepção da exposição à substância a testar.

Geralmente mantém-se uma ligeira pressão negativa no interior da câmara para impedir fugas da substância a testar para a área envolvente. As câmaras deverão ser concebidas de forma a evitar a superlotação com os animais de experiência.

Em geral, para assegurar a estabilidade da atmosfera da câmara, o volume total dos animais de experiência não deverá ultrapassar 5 % do volume da câmara de exposição.

Deverá ser feita a medição ou monitorização de:

i) Débito do ar: o débito do ar na câmara deverá de preferência ser monitorizado continuamente;

ii) Concentração: durante o período de exposição diária a concentração da substância a testar não deve variar mais que ± 15 % em redor do valor médio. Durante toda a duração do estudo as concentrações diárias deverão ser mantidas o mais constantes possível;

iii) Temperatura e humidade: para os roedores a temperatura deve ser mantida a 22 °C (± 2 °C) e a humidade dentro da câmara será de 30 a 70 % excepto quando se utilizar água para colocar a substância a testar em suspensão na atmosfera das câmaras. Estes parâmetros serão de preferência monitorizados permanentemente;

iv) Análise granulométrica das partículas: deverá efectuar-se uma repartição granulométrica das partículas nas atmosferas das câmaras onde se utilizem aerossóis líquidos ou sólidos. As partículas do aerossol deverão ter um diâmetro respirável para o animal de experiência utilizado. Serão retiradas amostras das atmosferas das câmaras de ensaio, na zona de respiração dos animais. A amostra de ar retirada deverá ser representativa da distribuição das partículas a que os animais são expostos e representará numa base gravimétrica, o conjunto do aerosol em suspensão, mesmo se uma grande parte deste não for inalável. As análises granulométricas serão feitas frequentemente durante a elaboração do sistema gerador para assegurar a estabilidade do aerosol, sendo depois feitas tantas vezes quanto as necessárias durante as exposições para determinar de forma adequada a estabilidade das distribuições de partículas a que os animais foram expostos.

Duração do estudo

A duração de um estudo de carcinogénese compreende a maior parte da vida dos animais de experiência. O teste deve terminar aos dezoito meses no ratinho e no hamster e aos vinte e quatro meses no rato; no entanto, no caso de algumas estirpes de animais com maior longevidade e/ou uma frequência baixa de tumores espontâneos, o fim deveria ser aos vinte e quatro meses no ratinho e no hamster e aos trinta meses no rato. Em alternativa, é aceitável terminar um estudo tão prolongado quando o número de sobreviventes do grupo tratado com a dose mais baixa ou do de controlo atingirem 25 %. Quando se terminar um teste em que exista uma diferença aparente na resposta consoante o sexo, deverá considerar-se cada sexo separadamente. Quando apenas os animais do grupo tratado com doses mais elevadas morrerem prematuramente por razões óbvias de toxicidade, não é necessário terminar a experiência na condição que as manifestações de toxicidade não causem problemas nos outros grupos. Para que um resultado negativo do teste seja aceitável é preciso que, por cada grupo, não haja mais de 10 % de animais perdidos devido à autólise, canibalismo ou por condições impróprias de alojamento e que a taxa de sobrevida em todos os grupos não seja inferior a 50 % depois de dezoito meses no caso do ratinho e do hamster e depois de vinte e quatro meses no caso do rato.

Procedimento

Observações

As observações diárias dos animais em cativeiro deverão incluir alterações da pele e do pêlo, dos olhos e membranas mucosas bem como dos aparelhos respiratório e circulatório, dos sistemas nervosos autónomo e central, da actividade somatomotora e do comportamento. É necessária uma observação regular dos animais para se evitar, tanto quanto possível, a perda de animais por causas como canibalismo, autólise dos tecidos ou condições impróprias de alojamento. Os animais moribundos serão imediatamente removidos e autopsiados.

As manifestações clínicas e a mortalidade de todos os animais serão registadas. Deverá tomar-se especial atenção à formação de tumores; deverão registar-se o momento do aparecimento, a localização, as dimensões, o aspecto e a progressão de todos os tumores nitidamente visíveis ou palpáveis.

Deverá determinar-se semanalmente o consumo alimentar (e o consumo de água, quando a substância a testar for administrada na água de beber) durante as primeiras treze semanas de estudo e depois com intervalos de cerca de três meses, excepto quando o estado de saúde dos animais ou o seu peso corporal justificarem outra frequência.

O peso corporal será determinado e registado individualmente uma vez por semana durante as treze primeiras semanas do teste e depois pelo menos de quatro em quatro semanas.

Exames clínicos

Hematologia

Se as observações efectuadas durante o período de cativeiro indicarem uma deterioração do estado de saúde de alguns animais durante o estudo, deverá obter-se uma fórmula leucocitária dos animais afectados.

Deverá efectuar-se a todos os animais um esfregaço de sangue aos doze meses, dezoito meses e antes do sacrifício. Será efectuada uma fórmula leucocitária em amostras dos animais do grupo tratado com a dose mais elevada e dos controlos. Se estes resultados, em especial os obtidos antes do sacrifício ou os provenientes dos exames histopatológicos indicarem necessidade disso, serão obtidas fórmulas leucocitárias dos animais do(s) grupo(s) tratado(s) com a dose imediatamente inferior.

Autópsia

Todos os animais serão submetidos a uma autópsia geral, incluindo os que morreram no decurso da experiência ou que tenham sido sacrificados por se encontrarem moribundos. Deverão ser conservados todos os tumores ou lesões nitidamente visíveis e as lesões suspeitas de serem tumores.

Deverão ser conservados em meios adequados para um possível exame histopatológico ulterior, os seguintes orgãos e tecidos: encéfalo (incluindo cortes da medula/protuberância, córtex cerebeloso, córtex cerebral), hipófise, tiroideia/paratiroideias, todo o tecido tímico, traqueia e pulmões, coração, aorta, glândulas salivares, fígado, baço, rins, supra-renais, pâncreas, gónadas, útero, orgãos genitais anexos, pele, esófago, estômago, duodeno, íleo, cego, cólon, recto, bexiga, gânglio linfático representativo, glândula mamária na fêmea, musculatura da coxa, nervo periférico, esterno com medula óssea, fémur (incluindo articulação), medula espinhal a três níveis (cervical, mediotorácico e lombar) e olhos.

A insuflação de um fixador nos pulmões e na bexiga constitui a melhor maneira de preservar estes tecidos; a insuflação dos pulmões nos estudos de inalação é essencial para um exame histopatológico apropriado. Nos estudos de inalação deve conservar-se toda a via respiratória, incluindo as fossas nasais, faringe e laringe.

Exames histopatológicos

a) Serão submetidos a um exame histopatológico completo os orgãos e tecidos de todos os animais que morrerem ou forem sacrificados durante o teste, nos grupos tratados com a dose mais elevada e de controlo;

b) Todos os tumores nitidamente visíveis ou as lesões suspeitas de serem tumores deverão ser examinadas microscopicamente, em todos os grupos;

c) Se se observar uma diferença significativa na incidência de lesões neoplásicas entre o grupo tratado com a dose mais elevada e o de controlo, deverão ser efectuados exames histopatológicos a esses orgãos ou tecidos em particular, nos outros grupos;

d) Se a sobrevida no grupo tratado com a dose mais elevada for substancialmente inferior à do grupo de controlo, então deverá ser submetido a um exame completo o grupo tratado com a dose imediatamente inferior;

e) Se no grupo exposto à dose mais elevada se observar uma indução de efeitos tóxicos ou outros susceptíveis de afectar a resposta neoplásica, deverá ser submetido a um exame completo o grupo tratado com a dose imediatamente inferior.

2. RESULTADOS

Os resultados deverão ser resumidos na forma de quadros, indicando para cada grupo da experiência o número de animais no início, o número de animais apresentando tumores detectados durante o teste, o momento da detecção e o número de animais em que se observaram tumores na autópsia. Os resultados serão avaliados com um método estatístico adequado. Poderá utilizar-se qualquer método estatístico reconhecido.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

— espécie, estirpe, origem, condições de ambiente, dieta,

— condições experimentais:

Descrição do sistema de exposição:

incluindo concepção, tipo, dimensões, fonte de ar, sistema gerador de partículas e aerossóis, método de condicionamento do ar, tratamento do ar expirado e método de acondicionamento dos animais na câmara de exposição se esta for utilizada. Deverá ser descrito o equipamento utilizada para indicação da temperatura, humidade e, se necessário, estabilidade das concentrações do aerosol e granulometria.

Dados relativos à exposição

Deverão ser apresentados na forma de quadros indicando as médias e uma medida de variação (por exemplo: o desvio-padrão) e deverão incluir:

a) Os débitos do ar através do dispositivo de inalação;

b) A temperatura e a humidade do ar;

c) As concentrações nominais (quantidade total da substância a testar introduzida no dispositivo de inalação dividida pelo volume de ar);

d) Natureza do veículo, se utilizado;

e) Concentrações na zona de respiração;

f) Dimensões medianas das partículas (se necessário),

— doses (incluindo veículo, se utilizado) e concentrações,

— incidência dos tumores por sexo, dose e tipo de tumor,

— momento da morte durante o estudo ou indicação dos animais sobreviventes,

— resposta tóxica por sexo e por dose,

— descrição dos efeitos tóxicos e outros,

— momento de observação das manifestações anormais e sua evolução subsequente,

— dados relativos à alimentação e peso corporal,

— resultados do exame hematológico,

— resultados da autópsia,

— descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas,

— tratamento estatístico dos resultados e descrição dos métodos utilizados,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

TESTE COMBINADO DE TOXICIDADE CRÓNICA/CARCINOGÉNESE

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

O objectivo de um estudo combinado da toxicidade crónica/carcinogénese é determinar os efeitos tóxicos e carcinogénicos de uma substância numa espécie mamífera, após uma exposição prolongada.

Com este fim, o teste de carcinogénese é completado com, pelo menos, um grupo satélite tratado e um grupo satélite de controlo. A dose utilizada para o grupo satélite da dose mais elevada pode ser superior à do grupo tratado com a dose mais elevada no teste de carcinogénese. Os animais no estudo de carcinogénese são examinados do ponto de vista da toxicidade geral bem como da resposta carcinogénica. Os animais do grupo satélite tratado são examinados do ponto de vista da toxicidade geral.

A substância a testar é administrada sete dias por semana, pela via apropriada, a vários grupos de animais de experiência, à razão de uma dose por grupo durante a maior parte da sua vida. Durante e depois da exposição à substância a testar observam-se diariamente os animais de experiência para se detectar manifestações de toxicidade e o aparecimento de tumores.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Os animais são mantidos nas condições de alojamento e de alimentação da experiência, durante pelo menos 5 dias antes do teste. Antes do início do teste os animais jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos submetidos ao tratamento e de controlo.

Animais de experiência

A espécie preferida é o rato. Podem utilizar-se outras espécies (roedores ou não roedores) de acordo com os resultados de estudos anteriores. Devem utilizar-se animais jovens e sãos de estirpes correntes de laboratório e o tratamento deve começar o mais cedo possível após de desmame.

No início da experiência a diferença de peso entre os animais não deverá ultrapassar ± 20 % do peso médio. Se um estudo de toxicidade subcrónica-oral tiver constituído a fase preliminar de um estudo a longo prazo deve utilizar-se a mesma espécie e estirpe em ambos os estudos.

Número e sexo

No caso dos roedores serão utilizados pelo menos 100 animais (50 fêmeas e 50 machos) para cada dose e grupo de controlo correspondente. As fêmeas deverão ser nulíparas e não grávidas. Se estiver previsto o sacrifício de animais no decurso da experiência os efectivos devem ser aumentados do número de animais cujo sacrifício estiver previsto.

O(s) grupo(s) satélite(s) tratado(s) para a avaliação de efeitos patológicos diferentes de tumores, deverá conter 20 animais de cada sexo, enquanto o grupo satélite de controlo deverá conter 10 animais de cada sexo.

Doses e frequência de exposição

Para o estudo da carcinogénese devem utilizar-se pelo menos três doses, além do grupo de controlo correspondente. A dose máxima deverá produzir manifestações mínimas de toxicidade, como um ligeiro decréscimo da progressão de peso (menos de 10 %) sem alterar substancialmente o tempo de vida normal devido a efeitos diferentes de tumores.

A dose mínima não deverá interferir com o crescimento normal, desenvolvimento e longevidade do animal ou produzir qualquer efeito tóxico. Em geral não deverá ser inferior a 10 % da dose máxima.

A(s) dose(s) intermédia(s) terá(terão) um valor próximo da média entre a dose máxima e a dose mínima.

Os níveis da dose deverão ter em conta os dados obtidos nos ensaios e estudos de toxicidade efectuados anteriormente.

Para o estudo de toxicidade crónica, serão incluídos no estudo outros grupos tratados bem como grupos satélites de controlo correspondentes. A dose máxima administrada aos grupos satélite tratados deverá produzir sinais claros de toxicidade.

A frequência de exposição é, normalmente, diária.

Se a substância química for administrada na água de beber ou incorporada na dieta deve encontrar-se constantemente disponível.

Controlos

Deverá utilizar-se um grupo de controlo idêntico em todos os aspectos aos grupos tratados, com excepção da exposição à substância a testar.

Em condições especiais como em estudos por inalação implicando o emprego de aerossóis ou o uso de um emulsionante com actividade biológica não estudada em ensaios por via oral, deverá utilizar-se um grupo suplementar de controlo que não seja exposto ao veículo.

Via de administração

As três vias principais de administração são a oral, a cutânea e por inalação. A escolha da via de administração depende das características físico-químicas da substância a testar e da via mais provável de exposição humana.

Estudos por via oral

A via oral de administração é preferida salvo contra-indicações, se a substância a testar for absorvida pelo tubo digestivo e se a ingestão for uma via possível de exposição humana. Os animais podem receber a substância a testar na dieta, dissolvida na água de beber ou em cápsulas. Em condições ideais, a dose diária será administrada sete dias em cada sete, visto que a administração em cinco dias por cada sete pode permitir a recuperação do animal ou a diminuição de toxicidade no período em que o tratamento é interrompido e assim afectar os resultados e a avaliação subsequente. No entanto, por razões essencialmente práticas considera-se aceitável a administração cinco dias por semana.

Estudos por via cutânea

A exposição cutânea por aplicação com pincel na pele pode ser escolhida para simular uma via principal de exposição humana e também como modelo experimental para a indução de lesões cutâneas.

Estudos de inalação

Uma vez que os estudos de inalação colocam problemas técnicos de maior complexidade do que os por outras vias de administração, são dadas aqui recomendações mais pormenorizadas. Deve notar-se que a instilação endotraqueal pode constituir uma alternativa válida em certas situações específicas.

As exposições prolongadas (de longo prazo) são habitualmente calculadas em função da exposição humana prevista: os animais são expostos cinco dias em cada sete (exposição intermitente) à razão de seis horas por dia depois de se obterem as concentrações na câmara de experiência ou expostos sete dias em cada sete (exposição contínua) à razão de 22 a 24 horas por dia, destinando-se uma hora por dia à alimentação dos animais, segundo um horário regular, e à manutenção das câmaras. Em ambos os casos os animais são habitualmente expostos a uma concentração fixa da substância a testar.

Uma diferença essencial entre a exposição intermitente e a contínua reside no facto de na primeira os animais disporem de um período de 17 a 18 horas para recuperar dos efeitos da exposição diária e mesmo dum período mais longo, durante os fins-de-semana.

A escolha entre a exposição intermitente ou contínua será feita em função dos objectivos do estudo e da exposição humana que deve ser simulada. Convém, no entanto, ter em conta certas dificuldades técnicas: por exemplo, as vantagens da exposição contínua na simulação das condições do ambiente podem ser contrariadas pela necessidade de alimentar e dar de beber aos animais e ainda pela necessidade de técnicas mais complicadas de produção de aerossóis e de vapores bem como de monitorização.

Câmaras de exposição

Os animais não expostos à substância a testar em câmaras de inalação concebidas de forma a conseguir-se um fluxo de ar dinâmico de pelo menos doze renovações de ar por hora, uma concentração de oxigénio adequada e uma distribuição uniforme da substância a testar no ar. As câmaras de exposição e as câmaras de controlo serão idênticas quanto à construção e concepção a fim de garantirem condições de exposição comparáveis em todos os aspectos, com excepção da exposição à substância a testar. Geralmente mantém-se uma ligeira pressão negativa no interior da câmara para impedir fugas da substância a testar para a área envolvente. As câmaras deverão ser concebidas de forma a evitar a superlotação com os animais de experiência. Em geral, para assegurar a estabilidade da atmosfera da câmara, o volume total dos animais de experiência não deverá ultrapassar 5 % do volume da câmara de exposição.

Deverá ser feita a medição ou monitorização de:

i) Débito de ar: o débito de ar na câmara deverá, de preferência, ser monitorizado continuamente;

ii) Concentração: durante o período de exposição diária a concentração da substância a testar não deve variar mais que ± 15 % em redor do valor médio;

iii) Temperatura e humidade: para os roedores a temperatura deve ser mantida a 22 °C (± 2 °C) e a humidade dentro da câmara será de 30 a 70 % excepto quando se utilizar água para colocar a substância testada em suspensão na atmosfera da câmara. Estes parâmetros serão, de preferência, monitorizados permanentemente;

iv) Análise granulométrica das partículas: deverá efectuar-se uma distribuição granulométrica das partículas nas atmosferas das câmaras onde se utilizam aerossóis líquidos ou sólidos. As partículas do aerossol deverão ter um diâmetro respirável para o animal de experiência utilizado. Serão retiradas amostras das atmosferas das câmaras de ensaio, na zona de respiração dos animais. A amostra de ar retirada deverá ser representativa da distribuição das partículas a que os animais são expostos e representará, numa base gravimétrica, o conjunto do aerossol em suspensão, mesmo se uma grande parte deste não for inalável. As análises granulométricas serão feitas frequentemente durante a elaboração do sistema gerador para assegurar a estabilidade do aerossol sendo depois feitas tantas vezes quanto as necessárias durante as exposições para determinar de forma adequada a estabilidade das distribuições de partículas a que os animais foram expostos.

Duração do estudo

A duração da parte dedicada à carcinogénese compreende a maior parte da vida dos animais de experiência. O teste deve terminar aos 18 meses no ratinho e hamster e aos 24 meses no rato; no entanto, no caso de algumas estirpes de animais com maior longevidade e/ou uma frequência baixa de tumores espontâneos o fim deveria ser aos 24 meses no ratinho e no hamster e aos 30 meses no rato. Em alternativa é aceitável terminar um estudo tão prolongado quando o número de sobreviventes do grupo tratado com a dose mais baixa ou do de controlo atingirem 25 %. Quando se terminar um teste em que exista uma diferença aparente na resposta consoante o sexo, deverá considerar-se cada sexo separadamente. Quando apenas animais do grupo tratado com a dose mais elevada morrerem prematuramente por razões óbvias de toxicidade não é necessário terminar a experiência, na condição de que as manifestações de toxicidade não causem problemas nos outros grupos. Para que um resultado negativo dum teste seja aceitável é preciso que, por cada grupo, não haja mais de 10 % de animais perdidos devido a autólise, canibalismo ou problemas de manutenção e que a taxa de sobrevida em todos os grupos não seja inferior a 50 % depois de 18 meses no caso do ratinho e do hamster e depois de 24 meses no caso do rato.

Os grupos satélite de 20 animais tratados por sexo e os 10 animais de controlo por sexo associados, utilizados para o teste da toxicidade crónica, deverão ser conservados no estudo durante 12 meses pelo menos. Estes animais deverão ser escalados para sacrifício para uma avaliação da patologia relacionada com a substância a testar, não complicada por alterações geriátricas.

Procedimento

Observações

As observações diárias dos animais em cativeiro deverão incluir alterações da pele e do pêlo, olhos e membranas mucosas bem como dos aparelhos respiratório e circulatório, dos sistemas nervosos autónomo e central, da actividade somatomotora e do comportamento.

Os exames clínicos deverão ser efectuados com intervalos adequados aos animais dos grupos satélite tratados.

É necessário uma observação regular dos animais para se evitar, tanto quanto possível, a perda de animais por causas como o canibalismo, autólise dos tecidos ou condições impróprias de alojamento. Os animais moribundos serão imediatamente removidos e autopsiados.

As manifestações clínicas, incluindo alterações neurológicas e oculares, bem como a mortalidade de todos os animais, serão registadas. Deverá tomar-se especial atenção à formação de tumores; deverão registar-se o momento do aparecimento, a localização, as dimensões, o aspecto e a progressão de todos os tumores nitidamente visíveis ou palpáveis. O início e a progressão das manifestações tóxicas devem ser registados.

Deverá determinar-se semanalmente o consumo alimentar (e o consumo de água, quando a substância a testar for administrada na água de beber), durante as primeiras 13 semanas de estudo e depois com intervalos de cerca de três meses, excepto quando o estado de saúde dos animais ou o seu peso corporal indicarem a necessidade de outra frequência.

O peso corporal será determinado e registado individualmente em todos os animais uma vez por semana durante as 13 primeiras semanas do teste e depois pelo menos de quatro em quatro semanas.

Exames clínicos

Hematologia

Deverá ser efectuado um exame hematológico (por exemplo, concentração de hemoglobina, hematócrito, número total de eritrócitos, número total de leucócitos, plaquetas ou outros testes de coagulação) aos três meses, aos seis meses, e em seguida a intervalos de seis meses e no fim da experiência, em amostras de sangue recolhidas de dez ratos/sexo de cada grupo. Se possível, as amostras deveriam ser colhidas de cada vez nos mesmos ratos.

Se as observações efectuadas durante o período de cativeiro indicarem uma deterioração do estado de saúde de alguns animais durante o estudo, deverá obter-se uma fórmula leucocitária dos animais afectados.

Deverá obter-se uma fórmula leucocitária em amostras de sangue dos animais do grupo tratado com a dose mais elevada e dos controlos. Serão obtidas fórmulas no(s) grupo(s) tratado(s) com doses inferiores apenas no caso de se verificar uma grande discrepância entre o grupo tratado com a dose mais alta e os controlos, ou se indicado pelos achados patológicos.

Análise de urina

Serão colhidas amostras de urina para análise em dez ratos/sexo de todos os grupos; estas análises serão feitas se possível na mesma altura dos exames hematológicos. Deverão ser efectuadas as seguintes determinações, em cada animal individualmente ou, no caso dos roedores, numa *pool* de urina do mesmo grupo e do mesmo sexo:

— aspecto: volume e densidade para os animais tomados individualmente,

— proteínas, glicose, corpos cetónicos, sangue oculto (semi-quantitativamente),

— microscopia do sedimento urinário (semi-quantitativamente).

Bioquímica clínica

De seis em seis meses e no fim do estudo colher-se-ão amostras de sangue para determinações bioquímicas clínicas de todos os não roedores e a dez ratos/sexo de todos os grupos, e se possível, sempre dos mesmos ratos de cada vez. Além disso, será recolhida uma amostra pré-teste dos não roedores. O plasma preparado a partir destas amostras será utilizado para as seguintes determinações:

— concentração de proteínas totais,

— concentração de albumina,

— provas de função hepática (tais como a actividade da fostatase alcalina, actividade da transaminase glutâmico-pirúvica [1] e da transaminase glutâmico-oxaloacética [2], gama-glutamil transpeptidase, ornitina-descarboxilase,

— metabolismo dos hidratos de carbono como uma glicémia em jejum,

— testes da função renal como a ureia sanguínea.

(1) Designada actualmente por transaminase da alamina.
(2) Designada actualmente por transaminase da aspartato.

Autópsia

Todos os animais serão submetidos a uma autópsia geral, incluindo os que morrerem no decurso da experiência ou que tenham sido sacrificados por se encontrarem moribundos. Antes do sacrifício deverão colher-se amostras de sangue de todos os animais para se fazerem fórmulas leucocitárias. Deverão ser conservados todos os tumores ou lesões nitidamente visíveis e as lesões suspeitas de serem tumores. Tentar-se-á estabelecer correlações entre os achados macroscópicos e as observações microscópicas.

Deverão ser conservados todos os orgãos e tecidos para um exame histopatológico. Este procedimento inclui habitualmente os seguintes orgãos e tecidos: encéfalo (medula/protuberância, córtex cerebeloso, córtex cerebral), hipófise, tiroideia(incluindo paratiroideias), timo, pulmões (incluindo traqueia), coração, aorta, glândulas salivares, fígado (1), baço, rins (1), supra-renais (1), esófago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, cego, cólon, recto, bexiga, gânglios linfáticos, pâncreas, gónadas, orgãos genitais anexos, glândula mamária na fêmea, pele, musculatura, nervo periférico, medula espinhal (cervical, torácica, lombar), esterno com medula óssea e fémur (incluido articulação) e olhos.

Apesar da insuflação dos pulmões e bexiga com um fixador ser o meio óptimo de preservar os tecidos nos estudos da inalação, a insuflação dos pulmões é uma condição necessária para um exame histopatológico adequado. Em estudos especiais como os de inalação deve ser estudado todo o sistema respiratório, incluindo o nariz, faringe e laringe.

Se se fizerem outros exames clínicos, a informação obtida deverá estar disponível antes do exame microscópico, uma vez que pode fornecer indicações preciosas ao patologista.

Histopatologia

Para a parte referente ao teste de toxicidade crónica

Será efectuado um exame pormenorizado de todos os orgãos conservados de todos os animais do grupo satélite tratado com a dose mais elevada e do de controlo. Quando se observar uma patologia ligada à substância a testar no grupo satélite de dose mais elevada, os orgãos alvo de todos os outros animais em qualquer dos outros grupos satélites tratados deverão ser sujeitos a um exame histológico completo e pormenorizado bem como os dos grupos tratados no teste de carcinogénese, no fim desta parte do estudo.

Para a parte referente ao teste de carcinogénese

a) Serão submetidos a um exame histopatológico completo os orgãos e tecidos de todos os animais que morrerem ou forem sacrificados durante o teste e de todos os animais do grupo de controlo e de dose máxima;

b) Deverão ser examinados microscopicamente todos os tumores nitidamente visíveis ou lesões suspeitas de serem tumores;

c) Se se verificar uma diferença significativa entre a incidência de lesões neoplásicas no grupo da dose mais alta e no de controlo, deverá ser efectuado um exame histopatológico desse orgão ou tecido específico nos outros grupos;

d) Se a sobrevida do grupo de dose mais alta for substancialmente inferior à do grupo de controlo, deverá então ser submetido a um exame completo o grupo tratado com a dose imediatamente inferior;

e) Se no grupo exposto à dose mais elevada se observarem efeitos tóxicos ou outros susceptíveis de afectar a resposta neoplásica, serão submetidos a um exame completo os animais expostos à dose imediatamente inferior.

2. RESULTADOS

Os resultados deverão ser resumidos na forma de quadros, indicando para cada grupo de experiência o número de animais no início do teste, o número de animais apresentando tumores ou manifestações de toxicidade detectados durante o teste, o momento da detecção e o número de animais apresentando tumores na autópsia. Os resultados deverão ser avaliados com um método estatístico apropriado.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

— espécie, estirpe, origem, condições de ambiente, dieta,

(1) Estes orgãos, provenientes de 10 animais por sexo e por grupo no caso dos roedores, deverão ser pesados.

— condições experimentais:

Descrição do dispositivo de exposição:

incluindo concepção, tipo, dimensões, fonte de ar, sistema gerador de partículas e aerossóis, método de condicionamento de ar, tratamento do ar expirado, e o modo de acondicionamento dos animais na câmara de exposição, quando utilizada. Deverá ser descrito o equipamento para a medição de temperatura, da humidade e, se necessário, da estabilidade da concentração ou a granulometria das partículas;

Dados relativos à exposição:

Estes deverão ser apresentados na forma de quadros indicando as médias e uma medida de variação (por ex., o desvio-padrão) e deverão incluir:

a) Os débitos do ar através do dispositivo de inalação;

b) A temperatura e a humidade do ar;

c) As concentrações nominais (quantidade total da substância a testar introduzida no dispositivo de inalação dividada pelo volume de ar);

d) Natureza do veículo, se utilizado;

e) Concentrações na zona de respiração;

f) Dimensões médias das partículas (se necessário);

— doses (incluindo veículo, se utilizado) e concentrações,

— incidência dos tumores por sexo, dose e tipo de tumor,

— momento da morte durante o estudo ou indicação dos animais sobreviventes, incluindo o grupo satélite,

— resposta tóxica, por sexo e por dose,

— descrição dos efeitos tóxicos e outros,

— momento de observação das manifestações anormais e sua evolução subsequente,

— observações oftalmológicas,

— dados relativos à alimentação e peso corporal,

— testes hematológicos utilizados e todos os seus resultados,

— testes bioquímicos clínicos empregados e todos os seus resultados (incluindo todas as análises de urina),

— resultados da autópsia,

— descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas,

— tratamento estatístico dos resultados e descrição dos métodos utilizados,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

TESTE DE TOXICIDADE SOBRE A REPRODUÇÃO EM UMA GERAÇÃO

1. MÉDODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

Administra-se a substância a testar em várias doses graduais a vários grupos de animais, machos e fêmeas. Os machos deverão ser tratados durante o crescimento e pelo menos um ciclo espermatogénico completo (cerca de 56 dias no ratinho e 70 dias no rato) de forma que a substância testada provoque um efeito nocivo eventual na espermatogénese.

As fêmeas da geração progenitora (P) deverão ser tratadas durante pelo menos dois ciclos do estro para permitir que a substância testada provoque alguns efeitos nocivos no estro. Os animais são em seguida acasalados. Administra-se a substância testada aos animais de ambos os sexos durante o período de acasalamento, e depois unicamente às fêmeas durante a gestação e o período de aleitamento.

Se se administrar a substância por inalação será necessário modificar-se o método.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Antes do ensaio, os animais adultos jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos tratados e de controlo. Os animais são mantidos nas condições de alojamento e alimentação da experiência pelo menos durante cinco dias antes do início do teste. Recomenda-se a administração da substância a testar na alimentação ou na água de beber. Podem aceitar-se igualmente outras vias de administração. Deve utilizar-se o mesmo método de administração em todos os animais e durante toda a experiência. Se for utilizado um veículo ou outros aditivos para facilitar a administração devem estes ser comprovadamente isentos de efeitos tóxicos. O tratamento deverá ser efectuado durante os 7 dias da semana.

Animais de experiência

Selecção da espécie

As espécies preferidas são o rato ou o ratinho. Devem utilizar-se animais sãos, não sujeitos a experiências anteriores. As estirpes com taxas de fecundidade baixa não deverão ser utilizadas. Serão especificadas a espécie, a estirpe, o sexo, o peso e/ou a idade dos animais de experiência.

Para avaliar a fecundidade de modo adequado deverão ser estudados tanto machos como fêmeas. Todos os animais tratados e de controlo deverão estar desmamados antes do início do tratamento.

Número e sexo

Cada grupo tratado e cada grupo de controlo deve comportar um número de animais suficientes para obter cerca de 20 fêmeas grávidas de termo ou próximas deste.

O objectivo é a obtenção dum número de gestações e de ninhadas suficientes para permitir uma avaliação significativa do efeito da substância sobre a fecundidade, a gestação, o comportamento maternal dos animais da geração P bem como o aleitamento, o crescimento e o desenvolvimento da geração F_1 desde a concepção até ao desmame.

Condições experimentais

A alimentação e a água serão fornecidas *ad libitum*. Quando as fêmeas grávidas estiverem próximas do termo deverão ser colocadas em gaiolas individuais de parto ou de maternidade podendo ser-lhes fornecidos os materiais de nidificação necessários.

Doses

Devem utilizar-se pelo menos três grupos tratados e um grupo de controlo. Se for utilizado um veículo para a administração da substância a testar o grupo de controlo deverá receber o volume máximo de veículo que tenha sido utilizado. Se uma substância testada causar diminuição da ingestão de alimentos e da sua assimilação, pode tornar-se necessário um grupo de controlo negativo. Nas condições ideais, a não ser que existam limitações devidas à natureza físico-química ou efeitos biológicos da substância testada, a dose máxima deverá produzir um efeito tóxico mas não a morte dos animais progenitores (P). A(s) dose(s) intermédia(s) deverão induzir os efeitos tóxicos mínimos atribuíveis à substância a testar e a dose mínima não deverá produzir nenhum efeito nocivo observável nos progenitores ou na sua descendência. Quando a substância for administrada por gavage ou cápsula, a dose administrada a cada animal deverá ser calculada em função do peso corporal de cada um e ajustada semanalmente, tendo em conta modificações desse peso. No caso das fêmeas durante a gravidez, as doses podem ser calculadas em função do peso corporal no dia 0 ou 6, se desejado.

Teste limite

No caso de substâncias pouco tóxicas, se uma dose de pelo menos 1 000 mg/kg de peso não provocar nenhuns sinais de interferência com a capacidade de reprodução, podem considerar-se desnecessários estudos com outras doses. Se um estudo preliminar da dose máxima, com toxicidade materna evidente, não mostrar efeitos nocivos na fertilidade, poderão considerar-se desnecessários estudos com outras doses.

Procedimentos do teste

Plano de experiência

A substância a testar deverá ser administrada diariamente aos machos progenitores (P) assim que atingirem a idade de cinco a nove semanas depois do desmame e de um período de adaptação de, pelo menos, cinco dias. Nos ratos o tratamento é prosseguido durante dez semanas antes do período de acasalamento (nos ratinhos durante oito semanas). Os machos deverão ser sacrificados e examinados ou no fim do período de acasalamento ou em alternativa mantidos vivos prosseguindo-se com a administração da substância na comida, com vista à produção eventual duma segunda ninhada, devendo neste caso ser sacrificados e examinados um pouco antes do fim do estudo. No caso das fêmeas (P) o tratamento deverá começar depois de, pelo menos, cinco dias de adaptação e ser prosseguido durante, pelo menos, duas semanas antes do acasalamento. As fêmeas P deverão continuar a receber o seu tratamento diário durante as três semanas do período de acasalamento e gestação até ao desmame dos filhos F_1. Poderão admitir-se modificações do esquema de administração no caso de se disporem de outras informações sobre a substância testada, como a indução do metabolismo ou bio-acumulação.

Processo de acasalamento

Nos estudos de toxicidade sobre a reprodução, os acasalamentos poderão ser feitos seja 1:1 (um macho com uma fêmea) seja 1:2 (um macho com duas fêmeas).

No caso de um acasalamento 1:1 deve colocar-se a fêmea sempre com o mesmo macho até ficar grávida ou durante três semanas. Deverão examinar-se as fêmeas todas as manhãs para verificar a presença de esperma ou de rolhão vaginal. O dia 0 da gestação é definido como o dia em que se verifique a presença de rolhão vaginal ou de esperma.

Os casais em que o acasalamento não tiver sucesso devem ser avaliados para determinar as causas da aparente esterilidade. Isto pode implicar procedimentos como novo acasalamento com animais que já tenham procriado, proceder a um exame microscópico dos orgãos de reprodução ou ao exame do ciclo do estro ou da espermatogénese.

Número de animais por ninhada

Permite-se que os animais usados no estudo de fertilidade dêem à luz normalmente e criem a sua descendência até ao desmame sem homogeneização das ninhadas.

Se se fizer uma homogeneização das ninhadas sugere-se o seguinte método: entre o dia 1 e o dia 4 depois do nascimento, o número de animais por ninhada pode ser ajustado eliminando-se por selecção as crias suplementares a fim de obter, na medida do possível, quatro fêmeas e quatro machos por ninhada. Se o número de machos e de fêmeas não permitir obter quatro crias de cada sexo por ninhada pode aceitar-se um ajustamento parcial (por exemplo cinco machos e três fêmeas). Não são possíveis ajustamentos nas ninhadas com menos de oito crias.

Observações

Deve observar-se cada animal pelo menos uma vez por dia durante todo o período do ensaio. Deverão registar-se as modificações de comportamento significativas, sinais de parto difícil ou prolongado bem como qualquer sinal de toxicidade incluindo a mortalidade. Durante os períodos de pré-acasalamento e acasalamento deve determinar-se diariamente o consumo alimentar. Depois do parto e durante o aleitamento deverá determinar-se o consumo alimentar (e o consumo de água quando o teste da substância for administrado na água para beber) no dia de se pesarem as crias. Os machos e fêmeas progenitores deverão ser pesados no primeiro dia do tratamento e, em seguida, uma vez por semana. Estas observações serão registadas individualmente para cada animal adulto. Calcula-se a duração da gestação a partir do dia 0 da gravidez. Cada ninhada deverá ser examinada o mais cedo possível, após o parto, para se determinar o número e o sexo das crias, os nado-mortos, os nado-vivos e a presença de anomalias macroscópicas.

As crias mortas e as crias sacrificadas no dia 4 deverão ser conservadas e examinadas para detectar eventuais anomalias. Devem contar-se as crias vivas e pesar as ninhadas na manhã após o nascimento, bem como no 4º e 7º dia e, em seguida, semanalmente até ao fim do estudo, sendo os animais nessa altura pesados individualmente. Deverão ser registadas as alterações físicas ou de comportamento nos progenitores do sexo feminino e na sua descendência.

Patologia

Autópsia

No momento do sacrifício ou da morte, no decurso do estudo, os animais da geração P deverão ser examinados macroscopicamente para se detectar qualquer anomalia estrutural ou alteração patológica, dedicando-se uma atenção especial aos orgãos do aparelho reprodutor. Devem procurar-se eventuais malformações nas crias mortas ou moribundas.

Histopatologia

Devem conservar-se para exame microscópico os ovários, o útero, o colo uterino, a vagina, os testículos, os epidídimos, as vesículas seminais, a próstata, a glândula coagulante, a hipófise e o(s) orgão(s) alvo de todos os animais P. No caso de estes orgãos não terem sido examinados noutros estudos com doses repetidas, deverão ser feito exames histológicos a todos os animais do grupo tratado com dose mais elevada, do grupo de controlo e aos animais mortos durante o estudo, quando tal for praticável.

Os orgãos que apresentarem alterações nestes animais serão também examinados em todos os outros animais P. Neste caso deverá efectuar-se um exame microscópico de todos os tecidos que apresentarem alterações patológicas macroscópicas. Como foi já sugerido no procedimento para o acasalamento, os orgãos reprodutores dos animais suspeitos de esterilidade poderão ser submetidos a um exame microscópico.

2. RESULTADOS

Os resultados podem ser resumidos em quadros, indicando para cada grupo experimental o número de animais no início do estudo, o número de machos férteis, o número de fêmeas grávidas, os diversos tipos de alterações, e a percentagem de animais apresentando cada tipo de alteração.

Se possível, os resultados numéricos deverão ser avaliados com um método estatístico apropriado. Pode ser utilizado qualquer método estatístico reconhecido.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá também incluir as seguintes informações:

— espécie/estirpe utilizada,

— resposta tóxica por sexo e por dose, incluindo fertilidade, gestação e viabilidade,

— momento da morte no decurso do estudo ou indicação dos animais sobreviventes no fim do estudo,

— quadro apresentando os pesos de cada ninhada, o peso médio das crias e os pesos individuais das crias no fim do estudo,

— efeito tóxico ou outro sobre a reprodução, a descendência e o crescimento pós-natal,

— dia da observação de qualquer manifestação anormal e sua evolução subsequente,

— peso corporal dos animais P,

— resultados da autópsia,

— descrição pormenorizada das observações microscópicas,

— tratamento estatístico dos resultados se necessário,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

TESTE DE TOXICIDADE SOBRE A REPRODUÇÃO EM DUAS GERAÇÕES

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

Administra-se a substância a testar em várias doses graduais a vários grupos de animais, machos e fêmeas. Os machos da geração paterna (P) deverão ser tratados durante o crescimento e pelo menos um ciclo espermatogénico completo (cerca de 56 dias no ratinho e 70 dias no rato) de forma que a substância testada provoque um efeito nocivo eventual na espermatogénese.

As fêmeas da geração progenitora (P) deverão ser tratadas durante pelo menos dois ciclos do estro para permitir que a substância testada provoque alguns efeitos nocivos no estro. Os animais são em seguida acasalados. Administra-se a substância testada aos animais de ambos os sexos durante o período de acasalamento, e depois unicamente às fêmeas durante a gestação e o período de aleitamento. Na ocasião do desmame continua a administrar-se a substância à geração F_1 durante o crescimento até à idade adulta, ao acasalamento e produção de uma geração F_2, até ao desmame da geração F_2. Se se administrar a substância por inalação será necessário modificar-se o método.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Antes do ensaio os animais jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos tratados e de controlo. Os animais da geração (P) são mantidos nas condições de alojamento e alimentação da experiência pelo menos durante cinco dias antes do início do teste. Recomenda-se a administração da substância a testar na alimentação ou na água de beber. Podem aceitar-se igualmente outras vias de administração. Deve utilizar-se o mesmo método de administração em todos os animais e durante toda a experiência. Se for utilizado um veículo ou outros aditivos para facilitar a administração, devem estes ser comprovadamente isentos de efeitos tóxicos. O tratamento deverá ser efectuado durante os sete dias da semana.

Animais de experiência: Selecção da espécie

As espécies preferidas são o rato ou o ratinho. Devem utilizar-se animais P sãos, não sujeitos a experiências anteriores. As estirpes com taxas de fecundidade baixa não deverão ser utilizadas. Serão especificadas a espécie, a estirpe, o sexo, o peso e/ou a idade dos animais de experiência.

Para avaliar a fecundidade de modo adequado deverão ser estudados tanto machos como fêmeas. Todos os animais tratados e de controlo deverão estar desmamados antes do início do tratamento.

Número e sexo

Cada grupo tratado e cada grupo de controlo deve comportar um número de animais suficiente para obter cerca de 20 fêmeas grávidas de termo ou próximas deste. O objectivo é a obtenção dum número de gestações e de ninhadas suficientes para permitir uma avaliação significativa do efeito da substância sobre a fecundidade, a gestação, o

comportamento maternal dos animais da geração P bem como o aleitamento, o crescimento e o desenvolvimento da geração F_1 desde a concepção até à maternidade, assim como o desenvolvimento da sua descendência (F_2) até ao desmame.

Condições experimentais

A alimentação e a água serão fornecidas *ad libitum*. Quando as fêmeas grávidas estiverem próximas do termo deverão ser colocadas em gaiolas individuais de parto ou de maternidade podendo ser-lhes fornecidos os materiais de nidificação necessários.

Doses

Devem utilizar-se pelo menos três grupos tratados e um grupo de controlo. Se for utilizado um veículo para a administração da substância a testar o grupo de controlo deverá receber o volume máximo de veículo que tenha sido utilizado. Se uma substância testada causar diminuição da ingestão de alimentos e da sua assimilação, pode tornar-se necessário um grupo de controlo negativo. Nas condições ideais, a não ser que existam limitações devidas à natureza físico-química ou efeitos biológicos da substância testada, a dose máxima deverá produzir um efeito tóxico mas não a morte dos animais progenitores (P). A(s) dose(s) intermédia(s) deverão induzir os efeitos tóxicos mínimos atribuíveis à substância a testar e a dose mínima não deverá produzir nenhum efeito nocivo observável nos progenitores ou na sua descendência. Quando a substância for administrada por gavage ou cápsula, a dose administrada a cada animal deverá ser calculada em função do peso corporal de cada um e ajustada semanalmente, tendo em conta modificações desse peso. No caso das fêmeas durante a gravidez, as doses podem ser calculadas em função do peso corporal no dia 0 ou 6, se desejado.

Teste limite

No caso de substâncias pouco tóxicas, se uma dose de, pelo menso, 1 000 mg/kg de peso não provocar nenhuns sinais de interferência com a capacidade de reprodução, podem considerar-se desnecessário estudos com outras doses. Se um estudo preliminar da dose máxima, com toxicidade materna evidente, não mostrar efeitos nocivos na fertilidade, poderão considerar-se desnecessários estudos com outras doses.

Procedimentos do teste

Plano da experiência

A substância a testar deverá ser administrada diariamente aos machos progenitores (P) assim que atingirem a idade de cinco a nove semanas depois do desmame e de um período de adaptação de pelo menos cinco dias. Nos ratos o tratamento é prosseguido durante dez semanas antes do período de acasalamento (nos ratinhos durante oito semanas). Os machos deverão ser sacrificados e examinados ou no fim do período de acasalamento ou em alternativa mantidos vivos prosseguindo-se com a administração da substância na comida, com vista à produção eventual duma segunda ninhada, devendo neste caso ser sacrificados e examinados um pouco antes do fim do estudo. No caso das fêmeas (P) o tratamento deverá começar depois de pelo menos cinco dias de adaptação e ser prosseguido durante pelo menos duas semanas antes do acasalamento. As fêmeas P deverão continuar a receber o seu tratamento diário durante as três semanas do período de acasalamento e gestação até ao desmame dos filhos F_1. Poderão admitir-se modificações do esquema de administração no caso de se disporem de outras informações sobre a substância testada, como a indução do metabolismo ou a bio-acumulação.

O tratamento dos animais F_1 começa na ocasião do desmame e termina quando são sacrificados.

Processo de acasalamento

Nos estudos de toxicidade sobre a reprodução, os acasalamentos poderão ser feitos seja 1:1 (um macho com uma fêmea) seja 1:2 (um macho com duas fêmeas).

No caso de um acasalamento 1:1 deve colocar-se a fêmea sempre com o mesmo macho até ficar grávida ou durante três semanas. Deverão examinar-se as fêmeas todas as manhãs para verificar a presença de esperma ou de rolhão vaginal. O dia 0 da gestação é definido como o dia em que se verifique a presença de rolhão vaginal ou de esperma.

Tendo em conta a espermatogénese, a descendência F_1 não poderá ser acasalada até que ela atinja a idade de, pelo menos, onze semanas nos ratinhos e treze semanas nos ratos. Para o acasalamento da descendência F_1, são seleccionados ao acaso, um macho e uma fêmea de cada ninhada, com vista a um acasalamento cruzado com uma cria de uma outra ninhada, com o mesmo grupo de dosagem, tendo em vista o abtenção da geração F_2. Os machos e fêmeas F_1 que não tenham sido seleccionados para o acasalamento serão sacrificados na ocasião do desmame.

Os casais em que o acasalamento não tiver sucesso devem ser avaliados para determinar as causas da aparente esterilidade. Isto pode implicar procedimentos como novo acasalamento com animais que já tenham procriado, proceder a um exame microscópico dos orgãos de reprodução ou ao exame do ciclo do estro ou da espermatogénese.

Número de animais por ninhada

Permite-se que os animais usados no estudo de fertilidade dêm à luz normalmente e criem a sua descendência até ao desmame sem homogeneização das ninhadas.

Se se fizer uma homogeneização das ninhadas sugere-se o seguinte método: entre o dia 1 e o dia 4 depois do nascimento, o número de animais por ninhada pode ser ajustado eliminando-se por selecção as crias suplementares a fim de obter, na medida do possível, quatro fêmeas e quatro machos por ninhada. Se o número de machos e de fêmeas não permitir obter quatro crias de casa sexo por ninhada pode aceitar-se um ajustamento parcial (por exemplo, cinco machos e três fêmeas). Não são possíveis ajustamentos nas ninhadas com menos de oito crias. Para as ninhadas F_2 o ajustamento efectua-se da mesma maneira.

Observações

Deve observar-se cada animal pelo menos uma vez por dia durante todo o período do ensaio. Deverão registar-se as modificações de comportamento significativas, sinais de parto difícil ou prolongado bem como qualquer sinal de toxicidade incluindo a mortalidade. Durante os períodos de pré-acasalamento e acasalamento deve determinar-se diariamente o consumo alimentar. Depois do parto e durante o aleitamento deverá determinar-se o consumo alimentar no dia de se pesarem as crias. Os machos e fêmeas progenitores (P e F_1) deverão ser pesados no primeiro dia do tratamento e, em seguida, uma vez por semana. Estas observações serão registadas individualmente para cada animal adulto.

Calcula-se a duração da gestação a partir do dia 0 da gravidez. Cada ninhada deverá ser examinada o mais cedo possível após o parto para se determinar o número e o sexo das crias, os nado-mortos, os nado-vivos e a presença de anomalias macroscópicas.

As crias mortas e as crias sacrificadas no dia 4 deverão ser conservadas e examinadas para detectar eventuais anomalias. Devem contar-se as crias vivas e pesar as ninhadas na manhã, após o nascimento, bem como no 4º e 7º dia e, em seguida, semanalmente até ao fim do estudo, sendo os animais nessa altura pesados individualmente. Deverão ser registadas as alterações físicas ou de comportamento nos progenitores do sexo feminino e na sua descendência.

Patologia

Autópsia

Todos os animais P e F_1 deverão ser sacrificados quando deixarem de ser necessários para se avaliar os efeitos sobre a reprodução. A descendência F_1 não seleccionada para o acasalamento bem como toda a descendência F_2 deverão ser sacrificadas na ocasião do desmame.

No momento do sacrifício ou da morte, no decurso do estudo, os animais da geração P e F_1 deverão ser examinados microscopicamente para se detectar qualquer anomalia estrutural ou alteração patológica, dedicando-se uma atenção especial aos orgãos do aparelho reprodutor. Devem procurar-se eventuais malformações nas crias mortas ou moribundas.

Histopatologia

Devem conservar-se para exame microscópico os ovários, o útero, o colo uterino, a vagina, os testículos, os epidídimos, as vesículas seminais, a próstata, a glândula coagulante, a hipófise e o (s) orgão(s) alvo de todos os animais P e F_1. No caso de estes orgãos não terem sido examinados noutros estudos com doses repetidas, deverão ser feitos exames histológicos a todos os animais do grupo tratado com a dose mais elevada, ao grupo de controlo e aos animais mortos durante o estudo, quando tal for praticável.

Os orgãos que apresentarem alterações nestes animais serão também examinados em todos os animais dos grupos tratados com outras doses. Neste caso deverá efectuar-se um exame microscópico de todos os tecidos que apresentarem alterações patológicas macroscópicas. Como foi já sugerido no procedimento para o acasalamento, os orgãos reprodutores dos animais suspeitos de esterilidade poderão ser submetidos a um exame microscópico.

2. RESULTADOS

Tratamento dos resultados

Os resultados podem ser resumidos em quadros, indicando para cada grupo experimental o número de animais no início do estudo, o número de machos férteis, o número de fêmeas grávidas, os diversos tipos de alterações, e a percentagem de animais apresentando cada tipo de alteração.

Se possível, os resultados numéricos deverão ser avaliados com um método estatístico apropriado. Pode ser utilizado qualquer método estatístico reconhecido.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá também incluir as seguintes informações:

— espécie/estirpe utilizada,

— resposta tóxica por sexo e por dose, incluindo fertilidade, gestação e viabilidade,

— momento da morte no decurso do estudo ou indicação dos animais sobreviventes no fim do estudo,

— quadro apresentando os pesos de cada ninhada, o peso médio das crias e os pesos individuais das crias no fim do estudo,

— efeito tóxico ou outro sobre a reprodução, a descendência e o crescimento pós-natal,

— dia da observação de qualquer manifestação anormal e sua evolução subsequente,

— peso corporal dos animais P e F_1 seleccionados para o acasalamento,

— resultado da autópsia,

— descrição pormenorizada das observações microscópicas,

— tratamento estatístico dos resultados se necessário,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

TOXICOCINÉTICA

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definições

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

Administra-se a substância a testar pela via apropriada. Consoante o objectivo do estudo, pode administrar-se a substância em dose única ou repetida, durante períodos de tempo determinados a um ou vários grupos de animais de experiência. Em seguida e, dependendo do tipo de estudo, determinam-se os níveis da substância e/ou seus metabolitos nos líquidos orgânicos, tecidos e/ou excreta.

Os estudos podem ser efectuados com formas «marcadas» ou «não marcadas» da substância a testar. No caso de utilização de um marcador, a posição deste na substância deve fornecer o máximo de informação sobre o destino do composto.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Aclimatizam-se às condições do laboratório jovens animais adultos e saudáveis, durante pelo menos cinco dias antes da experiência. Antes de começar o ensaio, distribuem-se os animais ao acaso pelos grupos submetidos ao tratamento. Em certas condições especiais podem utilizar-se animais muito jovens, fêmeas grávidas ou animais pré-tratados.

Condições experimentais

Animais de experiência

Os estudos toxicocinéticos podem ser efectuados numa ou várias espécies de animais apropriadas e deverão ter em conta as espécies já utilizadas ou que se preveja utilizar noutros estudos toxicológicos sobre a mesma substância a testar. Quando se utilizam roedores num ensaio, a variação de peso entre os animais não deve exceder ± 20 % do peso médio.

Número e sexo

Para os estudos de absorção e de excreção deverão utilizar-se grupos de quatro animais para cada dose. A escolha de um sexo determinado não é obrigatória mas, nalguns casos, pode tornar-se necessário estudar animais de ambos os sexos. No caso de haver respostas diferentes consoante o sexo serão tratados quatro animais de cada sexo. No caso de estudos com não roedores pode utilizar-se um menor número de animais.

Quando se estudar a distribuição nos tecidos, para calcular a dimensão inicial do grupo, deverá ter-se em conta o número de animais a sacrificar nas datas de exame pré-estabelecidas, bem como o número de exames.

Para o estudo do metabolismo, a dimensão do grupo tratado será adaptada às necessidades do estudo. Para os estudos com doses repetidas e com vários exames intermédios, deverá ter-se em conta, para calcular a dimensão do grupo tratado, o número de exames e o de sacrifícios previstos; no entanto, não pode ser inferior a dois animais.

A dimensão do grupo deverá ser suficiente para permitir uma avaliação aceitável do aumento dos níveis, planalto e da diminuição dos níveis (se for caso disso) da substância a testar e/ou metabolitos.

Doses

Na caso de administração única devem utilizar-se pelo menos duas doses diferentes. Deve haver um dose baixa com a qual não se observem efeitos tóxicos e uma dose elevada susceptível de modificar os parâmetros toxicinéticos ou com a qual se observem efeitos tóxicos.

No caso de administração repetida, a dose baixa é habitualmente suficiente mas, nalgumas circunstâncias, pode ser também necessária uma dose elevada.

Via de administração

Os estudos toxicinéticos serão efectuados usando a mesma via e, quando apropriado, o mesmo veículo já utilizado ou que se preveja utilizar noutros estudos de toxicidade. A substância a testar é habitualmente administrada por via oral (por *gavage* ou incorporação na alimentação) por aplicação na pele ou por inalação durante períodos de tempo determinados, a vários grupos de animais de experiência. A administração da substância a testar por via endovenosa pode ser útil para determinar a absorção relativa pelas outras vias. Além disso, podem obter-se informações úteis sobre o modo de distribuição da substância logo após a sua administração endovenosa.

A possibilidade duma interferência do veículo com a substância a testar deverá ser tomada em consideração. Deve prestar-se atenção particular às diferenças de absorção, quando a substância a testar for administrada por *gavage* ou na alimentação e à necessidade de determinar a dose com precisão quando a substância a testar for incorporada na alimentação.

Período de observação

Todos os animais devem ser observados diariamente registando-se os sinais de toxicidade e outras manifestações clínicas relevantes, incluindo o momento do aparecimento, sua gravidade e duração.

Procedimento

Depois de pesar os animais de experiência, administra-se a substância a testar por uma via apropriada. Se se considerar necessário, os animais poderão estar em jejum antes da administração da substância a testar.

Absorção

A taxa e o grau de absorção da substância administrada podem ser avaliadas por diferentes métodos, em presença e na ausência, de grupos de referência [1], por exemplo:

— determinação da quantidade da substância testada e/ou dos seus metabolitos nos excreta tais como urina, bílis, fezes, ar expirado e no conteúdo da carcaça,

— comparação da resposta biológica (por exemplo, estudo da toxicidade aguda) obtida, nos grupos de experiência, nos grupos de controlo e/ou nos grupos de referência,

— comparação da quantidade de substância e/ou de metabolitos excretados pelos rins nos grupos de experiência e nos de referência,

— determinação da área sob a curva nível plasmático/tempo da substância a testar e/ou dos seus metabolitos e comparação com os resultados obtidos num grupo de referência.

[1] Neste método entende-se por grupo de referência um grupo em que a substância a testar é administrada por outra via que assegure uma disponibilidade total de dose.

Distribuição

Existem actualmente duas abordagens à análise do(s) modo(s) de distribuição, podendo utilizar-se um deles ou ambos:

— as técnicas de autoradiografia de corpo inteiro fornecem informações qualitativas úteis,

— o sacrifício dos animais a intervalos diferentes depois da exposição e a determinação da concentração e da quantidade de substância a testar e/ou dos seus metabolitos nos tecidos e nos orgãos fornecem informações quantitativas.

Excreção

Nos estudos de excreção, recolhem-se a urina, as fezes, o ar expirado e, nalguns casos, a bílis. A quantidade da substância a testar e/ou de metabolitos presentes nestes excreta será medida várias vezes depois da exposição, até que cerca de 95 % da dose administrada tenha sido eliminada, ou durante sete dias consecutivos, se não se tiver atingido antes aquela percentagem.

Nalguns casos pode ser necessário considerar a quantidade de substância a testar eliminada no leite dos animais de experiência que estão a aleitar.

Metabolismo

Para determinar a via metabólica e a sua extensão serão analisadas amostras biológicas com métodos adequados. Serão estudadas as estruturas dos metabolitos e propostas vias metabólicas apropriadas quando houver necessidade de responder a questões levantadas em estudos toxicológicos anteriores. Pode ser útil a realização de estudos *in vitro* para obter informações sobre as vias metabólicas.

Podem obter-se informações complementares sobre a relação entre o metabolismo e a toxicidade com estudos bioquímicos tais como a determinação dos efeitos sobre sistemas de enzimas metabolizantes, da deplecção em compostos endógenos com grupos sulfidrilos não proteicos, e da ligação às macromoléculas.

2. RESULTADOS

Consoante o tipo de estudo efectuado, os resultados serão resumidos em quadros, acompanhados por gráficos quando tal for apropriado. Serão indicados para cada grupo de experiência as variações médias e estatísticas das medições em função do tempo, das doses, dos tecidos e dos orgãos, quando apropriado. O grau de absorção bem como as quantidades excretadas e o ritmo de excreção serão determinados por métodos apropriados. Quando forem efectuados estudos de metabolismo, será indicada a estrutura dos metabolitos identificados e serão apresentadas as possíveis vias metabólicas.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

Segundo o tipo de estudo efectuado, o relatório do ensaio deverá conter as seguintes informações:

— espécie, estirpe, origem, meio ambiente, regime alimentar,

— caracterização dos produtos marcados, se utilizados,

— doses e intervalos usados,

— via(s) de administração e qualquer veículo utilizado,

— efeitos tóxicos e outros observados,

— métodos de determinação da substância testada e/ou metabolitos nas amostras biológicas incluindo o ar expirado,

— apresentação em quadros das medidas efectuadas por sexo, dose, regime, tempo, tecidos e orgãos,

— indicação do grau de absorção e de excreção em função do tempo,

— métodos de caracterização e identificação dos metabolitos nas amostras biológicas,

— métodos utilizados para as medições bioquímicas relacionadas com o metabolismo,

— vias de metabolismo propostas,

— discussão de resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

TESTES DE MUTAGÉNESE E DESPISTE DE CARCINOGÉNESE

MUTAÇÃO GÉNICA — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

Podem utilizar-se várias estirpes haplóides e diplóides do fungo *Saccharomyces Cerevisiae* para medir a produção de mutações génicas induzidas por agentes químicos em presença e na ausênica de activação metabólica.

A medição de mutações *forward* (*forward mutations*) pode ser realizada nomeadamente pela medição da passagem dos mutantes vermelhos que exigem adenina (*ade*-1, *ade*-2) para uma forma branca duplamente exigente em adenina, assim como por sistemas selectivos como a indução de resistência à canavanina e à cicloheximida.

O método de mutação reversível mais frequentemente utilizado implica a utilização da estirpe haplóide XV 185-14C que inclui as mutações *nonsense* ocre *ade* 2 – 1, *arg* 4 – 17, *lys* 1-1 e *trp* 5-48, que são reversíveis por mutagénios que provoquem substituições de bases induzindo mutações num *locus* específico ou mutações supressivas ocre. A estirpe XV 185-14C inclui igualmente o marcador *his* 1-7, uma mutação *nonsense*, principalmente reversível pelas mutações de segundo *locus* e ainda o marcador *hom* 3-10 que é reversível por mutagénios conduzindo à ultrapassagem do quadro de leitura do código genético (*Frameshift Mutation*).

Das estirpes diplóides de *S. Cerevisiae* a única cujo uso está generalizado é a estirpe D_7 que é homozigótica para *ilv* 1-92.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

As soluções das substâncias a testar bem como as das substâncias de controlo serão preparadas imediatamente antes do ensaio, com a ajuda dum veículo apropriado. Quando se tretar de substâncias orgânicas não solúveis na água, deverão ser utilizados os solventes orgânicos como o etanol, a acetona ou o dimetilsulfóxido (DMSO) numa concentração não ultrapassando 2 % v/v. A concentração final do veículo não deve afectar de forma significativa a viabilidade das células nem as características de crescimento.

Activação metabólica

As células deverão ser expostas às substâncias a testar na presença e na ausência dum sistema exógeno de activação metabólica apropriado.

O método mais frequentemente utilizado consiste na adição da fracção pós-mitocondrial preparada a partir de fígados de roedores tratados previamente por indutores enzimáticos e adicionada de cofactores. Podem utilizar-se também outras espécies, tecidos, fracções pós-mitocondriais ou métodos para a activação metabólica.

Condições do ensaio

Estirpes de experiência

A estirpe haplóide XV 185-14 C e a estirpe diplóide D_7 são as mais frequentemente utilizadas em estudos de mutação génica. Podem também ser apropriadas outras estirpes.

Meios

Utilizam-se meios de cultura apropriados para determinar a sobrevida celular e o número de mutantes.

Uso de controlos negativos e positivos

Deverão ser realizados simultaneamente controlos positivos, controlos não tratados e controlos com solvente. Serão utilizadas substâncias químicas apropriadas como controlos positivos para cada fenómeno mutacional específico.

Concentrações de exposição

Deverão ser utilizados pelo menos cinco concentrações convenientemente espaçadas da substância a testar. No caso de substâncias tóxicas a concentração máxima testada não deverá diminuir a taxa de sobrevida abaixo de 5 a 10 %. As substâncias relativamente insolúveis na água serão testadas até ao seu limite de solubilidade com métodos apropriados. No caso das substâncias não tóxicas francamente solúveis na água a concentração máxima será determinada caso a caso.

Condições de incubação

Devem incubar-se as placas no escuro à temperatura de 28 a 30 °C durante quatro a sete dias.

Frequências de mutações espontâneas

Serão utilizadas as subculturas cujas frequências de mutação espontânea estejam situadas dentro dos limites normais admitidos.

Número de placas

Deverão utilizar-se pelo menos 3 placas por concentração para determinar os prototróficos produzidos por mutação génica e observar a viabilidade das células. No caso de experiências usando marcadores com uma pequena taxa de mutação como o *hom* 3-10, pode aumentar-se o número de placas utilizado para fornecer dados estatisticamente significativos.

Procedimento

As estirpes de *S. Cerevisiae* são tratadas habitualmente no curso dum ensaio em meio líquido, implicando a utilização de células em fase estacionária ou de crescimento. As experiências iniciais deveriam ser efectuadas com células em crescimento. Expõem-se à substância a testar $1\text{-}5 \times 10^7$ células/ml durante um período até 18 horas, à temperatura de 28 a 37 °C, agitando-se a mistura; deve adicionar-se uma quantidade adequada dum sistema de activação metabólica durante o tratamento. No fim do tratamento as células serão centrifugadas, lavadas, e semeadas num meio de cultura apropriado. Depois da incubação as placas serão examinadas para se determinar a taxa de sobrevida e a indução de mutações génicas.

Se a primeira experiência der resultados negativos deve realizar-se segunda, utilizando-se células em fase estacionária. Se a primeira experiência der resultados positivos, estes serão confirmados por uma experiência independente apropriada.

2. **RESULTADOS**

Os resultados devem ser apresentados em quadros, indicando o número de colónias contadas, o número de mutantes, a taxa de sobrevida e a frequência de mutantes. Todos os resultados deverão ser confirmados por uma experiência independente. Os resultados deverão ser avaliados com métodos estatísticos adequados.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

— estirpe utilizada,

— condições do teste: células em fase estacionária ou de crescimento, composição dos meios, temperatura e duração da incubação, sistema de activação metabólica,

— condições do tratamento: níveis de exposição, procedimento e duração do tratamento, temperatura do tratamento, controlos positivos e negativos,

— número de colónias contadas, número de mutantes, taxa de sobrevida e frequência de mutantes, relação dose/resposta se possível, avaliação estatística dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

RECOMBINAÇÃO MITÓTICA — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

A recombinação mitótica no *Saccharomyces Cerevisiae* pode ser detectada ao nível intergénico (ou mais generalizadamente entre um gene e o seu centrómero) e ao nível intragénico. O primeiro caso denomina-se *crossing-over* mitótico e dá origem a trocas recíprocas, enquanto no segundo caso as trocas são não-recíprocas a maior parte das vezes, sendo este denominado conversão génica. O *crossing-over* é geralmente detectado pela produção de colónias ou de sectores recessivos homozigóticos a partir de uma estirpe heterozigótica, enquanto a conversão génica é detectada pela produção de prototróficos revertidos duma estirpe auxotrófica heteroalélica contendo dois alelos defeituosos diferentes do mesmo gene. As estirpes mais correntemente utilizadas para detectar uma conversão génica mitótica são as D_4 (heteroalélica para *ade* 2 e *trp* 5), D_7 (heteroalélica para *trp* 5), BZ_{34} (heteroalélica para *arg* 4) e JDl (heteroalélica para *his* 4 e *trp* 5). O *crossing-over* mitótico produzindo sectores homozigóticos de cor vermelha e rosa pode ser determinado com D_5 ou D_7 (que mede também a convervão génica mitótica e a mutação reversível para *ilv* 1—92), sendo estas duas estirpes heteroalélicas complementares para os alelos *ade* 2.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método do ensaio

Preparativos

As soluções das substâncias a testar assim como das substâncias de controlo ou de referência deverão ser preparadas imediatamente antes do ensaio, com a ajuda do veículo apropriado. No caso de substâncias orgânicas insolúveis na água deverão utilizar-se solventes orgânicos como o etanol, a acetona e o dimetilsulfóxido (DMSO), em concentrações não ultrapassando 2 % v/v. A concentração final do veículo não deverá afectar de maneira significativa a viabilidade das células nem as características de crescimento.

Activação metabólica

As células serão expostas às substâncias a testar na presença e na ausência de um sistema exógeno de activação metabólica. O método mais frequentemente utilizado consiste na adição da fracção pós-mitocondrial preparada a partir de fígados de roedores tratados previamente com indutores enzimáticos e adicionada de cofactores. Podem também utilizar-se outras espécies, tecidos, fracções pós-mitocondriais ou métodos para activação metabólica.

Condições do ensaio

Estirpes de experiência

As estirpes mais frequentemente utilizadas são as diplóides D_4, D_5, D_7 e JDl. Podem também ser apropriadas outras estirpes.

Meios

Utilizam-se os meios de cultura apropriados para determinar a taxa de sobrevida e a frequência de recombinações mitóticas.

Uso de controlos negativos e positivos

Deverão ser realizados simultaneamente controlos positivos, controlos não tratados e controlos com solvente. Serão utilizadas substâncias químicas apropriadas como controlos positivos para cada tipo específico de recombinação.

Concentrações de exposição

Deverão ser utilizadas pelo menos cinco concentrações convenientemente espaçadas da substância a testar. A citotoxicidade e a solubilidade são alguns dos factores a ter em consideração. A concentração mais fraca não deve ter qualquer efeito na viabilidade das células. No caso de produtos químicos tóxicos, a concentração máxima testada não deve diminuir a taxa de sobrevida abaixo de 5 a 10 %. Os produtos químicos relativamente insolúveis na água serão testados até ao seu limite de solubilidade por métodos apropriados. No caso de produtos químicos não tóxicos, francamente solúveis na água, a concentração máxima testada será determinada caso a caso.

As células podem ser expostas às substâncias a testar em fase estacionária ou em fase de crescimento durante períodos de duração até 18 horas. No entanto, no caso de um tratamento de longa duração, as culturas serão examinadas ao microscópio para se detectar a formação de esporos, cuja presença tornará o teste nulo.

Condições de incubação

As placas serão incubadas no escuro a uma temperatura de 28 a 30 °C, durante quatro a sete dias. As placas utilizadas para a determinação dos sectores homozigóticos vermelho e rosa produzidos por *crossing-over* mitótico serão conservadas num refrigerador a ± 4 °C durante mais um a dois dias antes da contagem, de modo a que a pigmentação das colónias interessadas possa intensificar-se.

Frequência de recombinações mitóticas espontâneas

Deverão utilizar-se subculturas cujas frequências de recombinação mitótica se situarem dentro da gama admitida normalmente.

Número de placas

Deverão ser semeadas pelo menos três placas por concentração a fim de determinar a viabilidade bem como o número de prototróficos produzidos por conversão génica mitótica.

No caso de determinação da homozigotia recessiva produzida por *crossing-over* mitótico, o número de placas será aumentado para se obter um número de colónias adequado.

Procedimento

As estirpes de *S. Cerevisiae* são tratadas habitualmente no curso de um ensaio em meio líquido, implicando a utilização de células em fase estacionária ou de crescimento. A experiências iniciais deveriam ser efectuadas com células em crescimento. São expostas $1—5 \times 10^7$ células/ml à substância a testar durante um período até 18 horas, à temperatura de 28 a 37 °C, agitando-se a mistura; deve adicionar-se uma quantidade adequada de um sistema de activação metabólica durante o tratamento. No fim do tratamento as células serão centrifugadas, lavadas e semeadas no meio de cultura adequado. Depois da incubação, as placas serão examinadas a fim de determinar a taxa de sobrevida e a indução de recombinação mitótica. Se a primeira experiência der resultados negativos deve realizar-se segunda, utilizando-se células em fase estacionária. Se a primeira experiência der resultados positivos, estes serão confirmados por uma experiência independente apropriada.

2. **RESULTADOS**

Os resultados devem ser apresentados em quadros, indicando o número de colónias contadas, o número de recombinantes, a taxa de sobrevida e a frequência de recombinantes.

Todos os resultados deverão ser confirmados por uma experiência independente.

Os resultados deverão ser avaliados com métodos estatísticos adequados.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá incluir as informações seguintes:

— estirpe utilizada,

— condições do teste: células em fase estacionária ou em fase de crescimento, composição dos meios, temperatura e duração da incubação, sistema de activação metabólica,

— condições de tratamento: concentração de exposição, procedimento e duração do tratamento, temperatura do tratamento, controlos positivos e negativos,

— número de colónias contadas, número de recombinantes, taxa de sobrevida e frequência de recombinação, relação dose/reposta se possível; avaliação estatística dos resultados,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO* — TESTE DE MUTAÇÃO GÉNICA

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substância de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

Os sistemas de cultura de células de mamíferos podem ser utilizadas para detectar mutações induzidas por substâncias químicas. Entre as linhas celulares mais utilizadas contam-se as células de linfoma do ratinho L 5178 Y e as linhas celulares CHO e V-79 de hamster chinês.

Nestas linhas celulares os sistemas mais frequentemente utilizados medem as mutações nos *loci* da timidina cinase (TK), da hipoxantina guanina-fosforibosil transferase (HPRT)(1) e da Na^+/k^+ ATPase. Os sistemas de mutação TK e HPRT detectam mutações de pares de bases, mutações por ultrapassagem do quadro de leitura do código genético (*frameshift mutations*) bem como pequenas delecções; o sistema Na^+/K^+ detecta unicamente mutações de pares de bases.

As células deficientes em timidina cinase devido à mutação *forward* (*forward mutation*) $TK^+ \rightarrow TK^-$ são resistentes à bromodesoxiuridina (BrdU), à fluorodesoxiuridina (FdU) ou à trifluorotimidina (TFT) uma vez que estes antimetabolitos não são incorporados nos nucleótidos celulares pela timidina cinase do sistema enzimático de «SOS»; os nucleótidos necessários ao metabolismo celular são unicamente obtidos a partir de uma síntese *de novo*. No entanto, em presença da timidina cinase a BrdU, FdU ou a TFT são incorporados nos nucleótidos, o que provoca uma inibição do metabolismo celular e consequente citotoxicidade. As células mutantes estão portanto aptas a proliferar na presença de BrdU, FdU ou TFT, ao contrário das células normais que possuem a timidina cinase. Do mesmo modo as células deficientes em HPRT são seleccionadas pela resistência à 8-azaguanina (AG) ou à 6-tioguanina (TG). As células que têm uma Na^+/K^+ ATPase alterada são seleccionadas pela resistência à ouabaína.

A citotoxicidade determina-se medindo o efeito da substância a testar sobre a capacidade de formar colónias (eficácia de *cloning*) ou pela taxa de crescimento das culturas. Determina-se a frequência dos mutantes semeando um número conhecido de células num meio contendo o agente selectivo para se detectar as células mutantes e num meio não contendo o agente selectivo para se determinar as células sobreviventes. Depois de um período de incubação adequado contam-se as colónias. As frequências de mutantes calculam-se a partir do número de colónias mutantes com a correcção relativa à taxa de sobrevida celular.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Células

Podem ser utilizadas diversas linhas celulares neste ensaio nomeadamente os sub-clones de L 5178Y, células CHO ou V-79 tendo uma sensibilidade demonstrada aos mutagénios químicos, uma grande eficácia de *cloning*, e uma baixa frequência de mutações espontâneas. As células podem ser examinadas periodicamente para verificar a estabilidade do cariotipo e deverá ser pesquisada a contaminação por *Mycoplasma*. Podem utilizar-se outros tipos celulares desde que a sua validade como reveladores de mutações génicas por via química seja devidamente comprovada.

(1) Anteriormente HGPRT.

Meio

Deverão utilizar-se meios de cultura e condições de incubação adequadas (por exemplo: temperatura, material de cultura de células, concentrações de CO_2 e humidade). Devem escolher-se os meios e os soros em função dos sistemas de selecção e do tipo de células utilizadas no estudo.

Substâncias a testar

As substâncias a testar podem ser preparadas nos meios de cultura ou dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados antes de proceder ao tratamento das células. A concentração final do veículo no meio de cultura não deverá afectar nem a viabilidade das células nem a taxa de crescimento.

Activação metabólica

As células serão expostas à substância a testar em presença e na ausência de um sistema exógeno de activação metabólica de mamífero. Se se utilizarem tipos celulares com actividade metabólica intrínseca, a natureza e a taxa dessa actividade devem ser comprovadamente adequadas à classe química da substância testada.

Condições do ensaio

Uso de controlos negativos e positivos

Devem ser incluídos em cada experiência controlos positivos utilizando uma substância com acção directa e uma substância que necessite de uma activação metabólica; deve também ser utilizado um controlo negativo (veículo).

Poderão ser utilizadas como controlos positivos as substâncias abaixo indicadas:

— substâncias com acção directa:
  — etilmetanosulfonato,
  — hicantona;
— substâncias com acção indirecta:
  — 2- acetilaminofluoreno,
  — 7,12-dimetilbenzantraceno,
  — N-nitrosodimetilamina.

Sempre que justificado deve ser incluído um controlo positivo suplementar, pertencendo à mesma classe química da substância a testar.

Concentrações de exposição

Serão utilizadas várias concentrações da substância a testar. Estas concentrações deverão produzir um efeito tóxico dependente da concentração: a máxima provocando uma taxa de sobrevida baixa, a mínima provocando uma taxa de sobrevida semelhante à provocada pelo controlo negativo. As substâncias relativamente insolúveis na água serão testadas até ao seu limite de solubilidade com métodos apropriados. Para as substâncias não tóxicas francamente solúveis na água a concentração máxima da substância a testar deverá ser determinada caso a caso.

Procedimento

O número de células usadas por cultura deverá estar relacionado com a frequência de mutações espontâneas; a regra geral consiste em utilizar um número de células viáveis igual a dez vezes o inverso da frequência de mutações espontâneas.

As células serão expostas durante um período de tempo adequado, sendo suficiente na maior parte dos casos um período de duas a cinco horas. As células com actividade metabólica intrínseca suficiente deverão ser expostas à substância a testar em presença e na ausência de um sistema de activação metabólica apropriado. No fim do período de exposição as células serão lavadas de forma a eliminar a substânia a testar e depois cultivadas para determinação da viabilidade e para permitir a expressão do fenótipo mutante.

No fim do período de expressão, que deverá ser suficientemente longo para permitir uma expressão fenotípica quase-óptima dos mutantes induzidos, as células serão cultivadas em meios contendo e não contendo agentes selectivos, para determinação do número de mutantes e da viabilidade.

Todos os resultados serão confirmados por uma experiência independente.

2. RESULTADOS

Os resultados deverão ser apresentados em quadros. As contagens de indução de mutações e de sobrevida por placa deverão ser apresentadas relativamente à substância a testar e aos controlos. Devem também ser indicados o número médio de colónias por placa assim como o desvio-padrão. A frequência de mutações deverá ser expressa em número de mutantes por número de células sobreviventes. A taxa de sobrevida e as eficácias de *cloning* serão expressas em percentagem da taxa de controlo.

Os resultados deverão ser avaliados com métodos estatísticos apropriados.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deve incluir as informações seguintes:

— linha celular usada, número de culturas de células, métodos de manutenção das culturas,

— condições do teste: composição dos meios, concentração de CO_2, concentração da substância a testar, veículo utilizado, temperatura de incubação, tempo de incubação, duração do período de expressão (incluindo o número de células semeado), subculturas e esquema de nutrição (se necessário), duração do tratamento, densidade celular durante o tratamento, tipo de sistema de activação metabólica utilizado, controlos positivos e negativos, agente selectivo utilizado,

— justificação da escolha das doses,

— método utilizado para a contagem das células viáveis e mutantes,

— avaliação estatística,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

LESÃO E REPARAÇÃO DO ADN — SÍNTESE NÃO PROGRAMADA — CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

O Teste de Síntese Não-Programada de ADN (Unscheduled DNA Synthesis-UDS) mede a síntese de ADN para reparação após excisão e remoção de um fragmento de ADN contendo uma região de lesão induzida por agentes químicos e físicos. O teste baseia-se na incorporação da timidina marcada com trítio (^{3}H-TdR) no ADN de células de mamífero não se encontrando na fase S do ciclo celular. Pode determinar-se a incorporação de ^{3}H-TdR examinando o ADN proveniente das células tratadas por auto-radiografia ou por contagem de cintilação em meio líquido (LSC-Liquid Scintilation Counting).

As células de mamífero em cultura, com a excepção dos hepatócitos primários de rato, são tratadas com a substância a testar em presença e na ausência dum sistema exógeno de activação metabólica. A UDS pode também ser medida por métodos *in vivo*.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

As substâncias a testar, bem como as de controlo ou de referência serão preparadas no meio de cultura, dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados, sendo depois diluídas em meio de cultura, antes de utilizadas no ensaio. A concentração final não deverá afectar a viabilidade celular.

Podem ser utilizadas neste ensaio culturas primárias de hepatócitos de rato, linfócitos humanos ou linhas celulares estabelecidas (por exemplo: fibroblastos humanos diplóides).

As células serão expostas à substância a testar em presença e na ausência de um sistema de activação metabólica apropriado.

Condições experimentais

Número de culturas

São necessárias para cada ponto experimental, pelo menos duas culturas celulares para a auto-radiografia e seis culturas celulares (ou menos se tal se justificar tecnicamente) para a contagem de cintilação em meio líquido.

Uso de controlos negativos e positivos

Deverão ser incluídos em cada experiência controlos simultâneos (não tratados e/ou veículo) com e sem activação metabólica. Para o ensaio com hepatócitos de rato, por exemplo, pode utilizar-se como controlo positivo o 7,12

DMBA (7,12-dimetil benzantraceno) ou o 2-AAF (2-acetilaminofluoreno). No caso de linhas celulares estabelecidas, em ensaios com auto-radiografia ou LSC realizados sem activação metabólica, pode utilizar-se como controlo o 4-NQO (4-nitroquinolina N-óxido); quando se tiver recorrido a sistemas de activação metabólica, a N-dimetil-nitrosamina é um dos compostos utilizáveis como controlo positivo.

Concentrações de exposição

Deverá utilizar-se uma gama de concentrações da substância a testar, para permitir uma boa determinação da resposta. A concentração máxima deverá produzir alguns efeitos citotóxicos. As substâncias relativamente insolúveis na água serão testadas até ao seu limite de solubilidade. No que respeita às substâncias não tóxicas francamente solúveis na água, a concentração máxima a testar deverá ser determinada caso a caso.

Células

Para a manutenção das culturas recorrer-se-á a meios de cultura, a uma concentração de CO_2, a uma temperatura e humidade apropriados. As linhas celulares estabelecidas deverão ser examinadas periodicamente para detectar uma contaminação por *Mycoplasma*.

Activação metabólica

Não se utiliza nenhum sistema de activação metabólica nas culturas primárias de hepatócitos.

As linhas celulares estabelecidas e os linfócitos são expostos à substância a testar em presença e na ausência de um sistema de activação metabólica apropriado.

Procedimentos

Preparação das culturas

As linhas celulares estabelecidas provenientes de culturas «mãe» (por exemplo: por tripsinização ou por agitação) são semeadas em recipientes de cultura numa densidade adequada e incubada a 37 °C.

As culturas de pouca duração de hepatócitos de rato são estabelecidas permitindo que os hepatócitos recentemente dissociados num meio apropriado possam aderir à superfície de crescimento.

As culturas de linfócitos humanos são realizadas com técnicas apropriadas.

Tratamento das culturas com substância a testar

Hepatócitos primários de rato

Tratam-se hepatócitos primários de rato, isolados recentemente, com a substância a testar no meio contendo ^{3}H-TdR, durante um período de tempo adequado. No fim do período de tratamento o meio será eliminado, as células lavadas, fixadas e secadas. As lâminas são mergulhadas numa emulsão de auto-radiografia [em alternativa pode usar-se uma película fotográfica (*stripping film*)] passando depois à exposição, revelação, coloração e contagem.

Linhas celulares estabelecidas e linfócitos

Técnicas auto-radiográficas: Expõem-se as culturas celulares à substância a testar durante períodos de tempo adequados, sendo tratadas em seguida com a ^{3}H-TdR. A duração da exposição será função da natureza da substância, da actividade do sistema metabólico e do tipo das células. Para detectar o pico da UDS, deverá acrescentar-se a ^{3}H-TdR, seja ao mesmo tempo que a substância a testar, seja nos minutos que se seguem à exposição à substância a testar. A escolha entre estas duas técnicas será determinada por eventuais interacções entre a substância testada e a ^{3}H-TdR. Para se poder fazer a distinção entre a UDS e a replicação semiconservativa do ADN pode inibir-se esta última utilizando-se, por exemplo, um meio deficiente em arginina, um baixo teor de sódio ou acrescentando-se hidroxiureia ao meio de cultura.

Medição LSC de UDS: Antes de proceder ao tratamento com a substância a testar, bloqueia-se a entrada das células na fase S da forma descrita acima; expõem-se em seguida as células à substância a testar, como descrito para a auto-radiografia. No fim do período de incubação extrai-se o ADN das células e determina-se a quantidade total de ADN bem como a quantidade de ^{3}H-TdR incorporada.

É preciso notar que, se forem utilizados linfócitos humanos, não é necessário suprimir a replicação semiconservativa do ADN nas culturas não estimuladas.

Análise

Determinações auto-radiográficas

Para determinar a UDS nas células em células em cultura não se contam os núcleos em fase -S. Deverão contar-se pelo menos 50 células por concentração. As lâminas serão codificadas antes da contagem. Em cada lâmina serão contados vários campos escolhidos ao acaso, suficientemente afastados uns dos outros. Determinar-se-á a quantidade de ^{3}H-TdR incorporado no citoplasma contando-se três superfícies do tamanho do núcleo no citoplasma de cada célula contada.

Determinação LSC

Nas determinações LSC-UDS deveria utilizar-se um número adequado de culturas para cada concentração e para os controlos.

Todos os resultados serão confirmados por experiências independentes.

2. RESULTADOS

O resultados deverão ser apresentados sob a forma de quadros.

2.1. Determinações auto-radiográficas

A quantidade de ^{3}H-TdR incorporada no citoplasma, bem como o número de grãos contados por núcleo celular, serão registados separadamente.

A média, a mediana e a moda podem ser utilizadas para descrever a distribuição da quantidade de ^{3}H-TdR incorporado no citoplasma, bem como o número de grãos por núcleo.

2.2. Determinação LSC

Para as determinações LSC a incorporação de ^{3}H-TdR deverá ser indicada sob a forma dpm/ug do ADN. Pode utilizar-se a média dos dpm/ug do ADN com o seu desvio-padrão para descrever a distribuição da incorporação.

Os resultados deverão ser avaliados com métodos estatísticos apropriados.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório

O relatório deverá conter as seguintes informações:

— células utilizadas, densidade e número de passagens na ocasião do tratamento, número de culturas celulares,

— métodos utilizados na manutenção das culturas, incluindo o meio, a temperatura e a concentração de CO_2,

— substância a testar, veículo, concentrações e justificação da escolha das concentrações usadas no teste,

— pormenores relativos aos sistemas da activação metabólica,

— esquema do tratamento,

— controlos positivos e negativos,

— técnica de auto-radiografia utilizada,

— métodos utilizados para bloquear a entrada das células na fase S,

— técnicas utilizadas para extracção do ADN e determinação da quantidade total de ADN nas determinações LSC,

— relação dose/resposta, se possível,

— avaliação estatística,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

TESTE *IN VITRO* DE TROCA ENTRE CROMÁTIDES DO MESMO CROMOSSOMA

(Sister Chromatid Exchange — SCE)

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

O ensaio de troca entre cromátides do mesmo cromossoma (SCE) constitui um teste de curto prazo, que se destina a detectar as trocas recíprocas de ADN entre as cromátides de um mesmo cromossoma em duplicação. As SCEs representam a troca recíproca de produtos de replicação do ADN em *loci* aparentemente homólogos. O processo de troca implica provavelmente uma cisão e uma fusão do ADN, apesar de sabermos pouco acerca da sua base molecular. Para detectar as SCEs é necessário poder marcar separadamente as cromátides do mesmo cromossoma; isto é possível pela incorporação da bromodesoxiuridina (BrdU) no ADN cromossómico durante dois ciclos celulares.

As células de mamífero *in vitro* são expostas à substância a testar na presença e na ausência dum sistema exógeno de activação metabólica de mamífero, se for caso disso, e colocadas num meio de cultura contendo (BrdU) durante dois ciclos de replicação. Após tratamento com um inibidor do fuso (por exemplo: colchicina) a fim de acumular as células numa fase da mitose metafase-*like* (c-metafase) recolhem-se as células e fazem-se preparações de cromossomas.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

— podem ser utilizadas no ensaio culturas primárias (linfócitos humanos) ou linhas celulares estabelecidas (por exemplo: células de ovário de hamster chinês). As linhas celulares deverão ser examinadas para detectar uma eventual contaminação por *Mycoplasma*,

— serão utilizados meios de cultura e condições de incubação adequados (por exemplo: temperatura, recipientes de cultura, concentração em CO_2 e humidade),

— as substâncias a testar podem ser preparadas nos meios de cultura, dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados antes de proceder ao tratamento das células. A concentração final do veículo no meio de cultura não deverá afectar nem a viabilidade das células nem a taxa de crescimento, e os efeitos sobre a frequência de SCEs serão verificados por meio de um solvente de controlo,

— as células serão expostas à substância a testar na presença e na ausência de um sistema exógeno de activação metabólica de mamífero. Quando se utilizarem tipos celulares com actividade metabólica intrínseca, a taxa e a natureza dessa actividade deverão ser adequadas à classe química testada.

Condições experimentais

Número de culturas

Serão utilizadas pelo menos duas culturas separadas para cada ponto experimental.

Utilização de controlos negativos e positivos

Deverão ser incluídos em cada experiência controlos positivos utilizando uma substância com acção directa e uma substância necessitando de activação metabólica; deverá também utilizar-se um controlo para o veículo.

As substâncias seguintes podem, por exemplo, ser utilizadas como controlos positivos:

— substância com acção directa:
  — etilmetanosulfonato de etilo,
— substância com acção indirecta:
  — ciclofosfamida.

Se for caso disso, pode incluir-se um controlo positivo suplementar pertencendo à mesma classe química da substância a testar.

Concentração de exposição

Deveriam ser utilizadas pelo menos três concentrações da substância a testar, convenientemente espaçadas. A concentração máxima deverá produzir um efeito tóxico significativo mas permitindo ainda uma replicação celular adequada. As substâncias relativamente insolúveis na água serão testadas até ao seu limite de solubilidade com métodos apropriados. No caso de substâncias não tóxicas francamente solúveis na água a concentração máxima da substância a testar deverá ser determinada caso a caso.

Procedimento

Preparação das culturas

Utilizam-se linhas celulares estabelecidas provenientes de culturas «mãe» (por exemplo, por tripsinização ou por agitação), semeadas em recipientes de cultura, numa densidade adequada e incubadas a 37 °C. No caso de culturas em monocamada, o número de células por recipiente deveria ser ajustado de forma a que as culturas não estejam confluentes a mais de 50 % no momento da colheita. As células podem também ser utilizadas na forma de cultura em suspensão. As culturas de linfócitos humanos são preparadas a partir de sangue heparinizado utilizando técnicas apropriadas e incubadas a 37 °C.

Tratamento

São expostas à substância a testar células em fase exponencial de crescimento, durante um lapso de tempo adequado; na maior parte dos casos uma a duas horas podem ser suficientes, mas, nalguns casos, o tratamento pode ser prolongado para cobrir até dois ciclos celulares completos.

As células que não tiverem actividade metabólica intrínseca suficiente deverão ser expostas à substância a testar na presença e na ausência dum sistema de activação metabólica apropriado. No fim do período de exposição, as células são lavadas de forma a eliminar a substância testada, e depois cultivadas na presença de BrdU durante dois ciclos de replicação. Um outro método consiste na exposição simultânea das celulas à substância testada e à BrdU durante dois ciclos celulares completos.

As culturas de linfócitos humanos são tratados enquanto se encontrarem num estado de semi-sincronização.

As células são analisadas no decurso da segunda divisão após tratamento, garantindo assim a exposição das fases mais sensíveis de ciclo celular à substância a testar. Todas as culturas a que se adicionou BrdU serão manipuladas na obscuridade ou com pouca iluminação proveniente de lâmpadas incandescentes até ao momento da colheita das células, para reduzir a fotólise do ADN contendo BrdU.

Colheita das células

As culturas de células são tratadas com um inibidor do fuso (por exemplo: colchicina) uma a quatro horas antes da colheita. Cada cultura é colhida e processada separadamente para a preparação dos cromossomas.

Preparação dos cromossomas e coloração

As preparações de cromossomas são feitas com métodos *standard* de citogenética. Podem utilizar-se várias técnicas para corar as lâminas de forma a pôr em evidência as SCEs (por exemplo: o método por fluorescência mais Giemsa).

Análise

O número de células analisado será em função da frequência espontânea controlo de SCE. Habitualmente analisam-se pelo menos 25 metafases de boa qualidade, por cultura, para contar as SCEs. As lâminas são codificadas antes da análise. Para os linfócitos humanos apenas são analisadas as metafases contendo 46 centrómeros. Para as linhas celulares estabelecidas, apenas são analisadas as metafases com ± 2 centrómeros que o número modal. Deverá ser precisado se uma inversão de coloração ao nível do centrómero é ou não considerada como SCE. Os resultados serão confirmados por uma experiência independente.

2. RESULTADOS

Os resultados deverão ser apresentados em quadros. O número de SCEs por metafase e o número de SCEs por cromossoma são dados separadamente para todas as culturas, tratadas e controlos.

Os resultados serão analisados com métodos estatísticos adequados.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório deveria conter as informações seguintes:

— células utilizadas, métodos de manutenção da cultura celular,

— condições experimentais: composição de meios, concentração de CO_2, concentração da substância a testar, veículo utilizado, temperatura de incubação, tempo de tratamento, inibidor do fuso utilizado, concentração e duração do tratamento com este, tipo de sistema de activação de mamífero utilizado, controlos positivos e negativos,

— número de culturas celulares por ponto experimental,

— pormenores relativos à técnica utilizada na preparação das lâminas,

— número de metafases analisadas (resultados indicados separadamente para cada cultura),

— número médio de SCEs por célula e por cromossoma (resultados indicados separadamente para cada cultura),

— critério de contagem de SCEs,

— justificação da escolha das doses,

— relação dose/resposta, se possível,

— avaliação estatística,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

TESTE DE LETALIDADE RECESSIVA LIGADA AO SEXO NA *DROSOPHILA MELANOGASTER*

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

O teste de letalidade recessiva ligada ao sexo (SLRL — Sex Linked Recessive Letal Test) utilizando a *Drosophila melanogaster* detecta a ocorrência de mutações — mutações pontuais bem como pequenas delecções — na linha germinal do insecto. Esta prova é um ensaio de mutação *forward* capaz de detectar mutações em cerca de 800 *loci* do cromossoma X, o que representa cerca de 80 % de todos os *loci* deste cromossoma. O cromossoma X representa cerca de um quinto do genoma haplóide completo.

As mutações do cromossoma X de *Drosophila melanogaster* são expressas fenotipicamente nos machos portadores do gene mutante. Quando a mutação é letal no estado hemizigótico, a sua presença é deduzida a partir da ausência de um dos grupos de descendência masculina, em vez dos dois habitualmente produzidos por uma fêmea heterozigótica. O SLRL baseia-se nestes factos, utilizando cromossomas especificamente marcados e com rearranjos da sua estrutura.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Stocks

Podem ser utilizados machos dum *stock* de tipo selvagem bem definido e fêmeas do *stock* Muller-5. Podem também ser utilizados outros *stocks* de fêmeas marcadas adequadamente, com cromossomas X invertidos de forma múltipla.

Substância a testar

As substâncias a testar devem ser dissolvidas em água. As substâncias insolúveis na água podem ser dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados (por exemplo: uma mistura de etanol com Tween-60 ou 80) sendo depois diluídas em água ou numa solução salina antes da administração. Deve evitar-se como veículo o dimetilsulfóxido (DMSO).

Número de animais

O teste deve ser concebido com uma sensibilidade e grau de significância pré-estabelecido. A frequência de mutantes espontâneos observada no grupo de controlo irá influenciar fortemente o número de cromossomas tratados que devem ser analisados.

Via de administração

A administração pode ser oral, por injecção ou por exposição a gases ou vapores. A ingestão da substância testada pode ser feita por intermédio duma solução açucarada. Se necessário as substâncias podem ser dissolvidas numa solução de NaCL a 0,7 % e injectadas no tórax ou no abdómen.

Uso de controlos negativos e positivos

Devem ser incluídos controlos negativos (veículo) e positivos. No entanto, se existirem dados apropriados de experiências anteriores, não são necessários controlos simultâneos.

Níveis de exposição

Devem utilizar-se três níveis de exposição. Para uma avaliação preliminar pode utilizar-se apenas uma única concentração da substância testada, podendo essa ser a concentração máxima tolerada ou a concentração produzindo alguns sinais de toxicidade. No caso de substâncias não tóxicas deverá utilizar-se a concentração máxima praticável.

Procedimento

Tratam-se com a substância a testar machos de fenótipo selvagem (com três a cinco dias de idade) sendo acasalados individualmente a um maior número de fêmeas virgens do *stock* Muller-5 ou outro *stock* marcado de forma apropriada (com cromossomas X invertidos de forma múltipla). Estas fêmeas serão substituídas de dois em dois ou de três em três dias por outras fêmeas virgens para se cobrir o ciclo germinal completo. A descendência destas fêmeas é examinada para detectar os efeitos sobre o esperma maduro, as espermátides em estádios precoces, intermédios ou tardios, os espermatócitos e as espermatogónias na ocasião do tratamento.

As fêmeas F_1 heterozigóticas provenientes dos cruzamentos mencionados acima são acasaladas individualmente (isto é, um fêmea por frasco de experiência) com os seus irmãos. Na geração F_2 examina-se cada cultura para detectar a ausência de machos do tipo selvagem. Se uma cultura revelar ser proveniente de uma fêmea F_1 portadora de um gene letal no cromossoma X paterno (isto é, quando não se observar nenhum macho portador do cromossoma tratado) devem testar-se as filhas dessa fêmea com o mesmo genotipo, para verificar se a letalidade se repete na geração seguinte.

2. RESULTADOS

Os resultados devem ser apresentados em quadros indicando o número de cromossomas X tratados, o número de machos não férteis e o número de cromossomas letais poer cada concentração de exposição e por cada período de acasalamento para cada macho tratado. O número de agregados de diferentes dimensões deverá ser indicado. Estes resultados deverão ser confirmados por uma experiência separada.

Deverão ser utilizados métodos estatísticos apropriados na avaliação dos testes de letalidade recessiva ligada ao sexo. O reagrupamento de genes letais recessivos provenientes dum único macho deverá ser considerado e avaliado com um método estatístico apropriado.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

— *stock: stocks* ou estirpes de *Drosophila* utilizados, idade dos insectos, número de machos tratados, número de machos estéreis, número de culturas F_2 estabelecidas, número de cromossomas portadores dum gene letal detectado em cada estádio das células germinais,

— critérios aplicados para determinar as dimensões dos grupos tratados,

— condições experimentais: descrição pormenorizada do esquema de tratamento e de amostragem, níveis de exposição, dados sobre a toxicidade, controlos negativos (solvente) e positivos se necessário,

— critérios aplicados na contagem das mutações letais,

— relação exposição/efeito, se possível, e avaliação estatística dos resultados,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

TESTES DE TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

Podem utilizar-se sistemas de cultura de células de mamífero para detectar *in vitro* alterações do fenótipo induzidas por substâncias químicas associadas com uma transformação maligna *in vivo*. Entre as culturas mais frequentemente utilizadas contam-se as C3H1OT ½, 3T3, SHE, rato Fischer; os testes baseiam-se nas alterações da morfologia celular, formação de ninhos celulares ou alterações ligadas à necessidade de ancoragem a um agar semi-sólido. Existem outros sistemas menos frequentemente utilizados que detectam outras alterações fisiológicas ou morfológicas nas células depois de uma exposição a carcinogénios químicos. Nenhum dos fenómenos finais destes testes *in vitro* apresenta uma relação mecanicista estabelecida com o cancro. Alguns dos sistemas de testes são capazes de detectar promotores de tumores. Pode determinar-se a citotoxicidade medindo o efeito da substância a testar sobre a capacidade para formar uma colónia (eficácia de *cloning*) ou ainda sobre as taxas de crescimento das culturas. A medição da citotoxicidade tem por fim determinar se a exposição da substância testada foi toxicologicamente significativa mas não pode servir para calcular a frequência das transformações em todas as provas uma vez que algumas destas podem implicar uma incubação prolongada e/ou uma nova passagem.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Células

Podem ser utilizadas várias linhas celulares ou células primárias, dependendo do teste de transformação utilizado. O investigador deve assegurar-se de que as células do teste efectuado apresentam a alteração fenotípica adequada depois da exposição a carcinogénios conhecidos e que a validade e fiabilidade do teste efectuado no seu laboratório sejam comprovadas e documentadas.

Meio

Deverão utilizar-se meios e condições de ensaio adequados ao teste de transformação utilizado.

Substância a testar

As substâncias a testar podem ser preparadas nos meios de cultura, e dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados antes do tratamento das células. A concentração final do veículo no sistema de cultura não deve afectar a viabilidade celular nem a taxa de crescimento, nem a incidência de transformações.

Activação metabólica

As células deverão ser expostas à substância a testar na presença e na ausência de um sistema de activação metabólica adequado. Alternativamente, quando se utilizar tipos de células com actividade metabólica intrínseca, a natureza dessa actividade será comprovadamente apropriada à classe química testada.

Condições do ensaio

Utilização de controlos positivos e negativos

Serão incluídos em cada experiência controlos positivos utilizando uma substância com acção directa e uma substância necessitando de activação metabólica; utilizar-se-á igualmente um controlo negativo (veículo).

Podem ser utilizadas como controlos positivos as seguintes substâncias:

— substâncias químicas com acção directa:
  — etilmetanosulfonato,
  — ß — propiolactona,
— substâncias necessitando de activação metabólica:
  — 2 — acetilaminofluoreno,
  — 4 — dimetilaminobenzeno,
  — 7,12 — dimetilbenzantraceno.

Deverá ser incluído, quando justificado, um controlo positivo suplementar pertencendo à mesma classe química que a substância testada.

Concentrações de exposição

Deverão ser utilizadas várias concentrações das substâncias a testar. Estas concentrações deverão produzir um efeito tóxico dependente da concentração; a concentração máxima deverá produzir uma baixa taxa de sobrevivência, a concentração mínima uma taxa de sobrevivência próxima da observada nos controlos negativos. As substâncias relativamente insolúveis na água serão testadas até ao seu limite de solubilidade com métodos apropriados. No caso de substâncias não tóxicas, francamente solúveis na água, a concentração máxima deverá ser determinada caso a caso.

Procedimento

As células serão expostas durante um período de tempo dependente do sistema celular utilizado, que pode implicar um novo tratamento acompanhado de mudança de meio (e se necessário uma nova mistura de activação metabólica) se a exposição for prolongada. As células que não tenham actividade metabólica intrínseca suficiente deverão ser expostas à substância a testar na presença e na ausência de um sistema de activação metabólica apropriado. No fim do período de exposição, as células são lavadas de forma a eliminar a substância testada e cultivadas em condições que permitam o aparecimento do fenótipo transformado em estudo sendo então determinada a incidência desta transformação. Todos os resultados deverão ser confirmados por uma experiência independente.

2. RESULTADOS

Os resultados deverão ser apresentados em quadros e podem ser apresentados de várias formas consoante o método utilizado, por exemplo, contagem por placa, placas positivas ou número de células transformadas. Quando apropriado, a sobrevivência será expressa em percentagem das taxas de controlo e a frequência de transformação corresponderá ao número de células transformadas por número de sobreviventes. Os resultados deverão ser avaliados com métodos estatísticos apropriados.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

— tipo de célula utilizada, número de culturas de células, métodos de manutenção das culturas de células,

— condições do teste: concentração da substância a testar, veículo usado, tempo de incubação, duração e frequência do tratamento, densidade celular durante o tratamento, tipo de sistema exógeno de activação metabólica utilizado, controlos positivos e negativos, especificação do fenótipo estudado, sistema selectivo usado (se apropriado); justificação da escolha das doses,

— método utilizado para contar as células viáveis e as transformadas;

— avaliação estatística,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

TESTE DE LETALIDADE DOMINANTE NO ROEDOR

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

A letalidade dominante provoca a morte do embrião ou do feto. A indução de letalidade dominante por exposição a uma substância química indica que a substância afectou o tecido germinal da espécie estudada. Admite-se geralmente que a letalidade dominante é devida a uma lesão cromossómica (alterações estruturais e numéricas). No caso dos animais tratados serem fêmeas a morte do embrião pode também ser devida a efeitos tóxicos.

Em geral, os machos são expostos à substância a testar e acasalados com fêmeas virgens não tratadas. Os diferentes estádios das células germinais podem ser testados separadamente utilizando-se períodos de acasalamento sequenciais. O aumento do número de implantes mortos por fêmea no grupo tratado em relação ao número de implantes mortos por fêmea no grupo de controlo reflecte as perdas após a implantação. As perdas antes da implantação podem ser calculadas por contagem dos corpos amarelos ou comparando o número total de implantes por fêmea no grupo tratado e no grupo de controlo. O efeito total de letalidade dominante é igual à soma das perdas antes e depois da implantação. O cálculo do efeito total da letalidade dominante baseia-se na comparação entre o número de implantes vivos por fêmea no grupo tratado e o registado no grupo de controlo. Uma diminuição do número dos implantes em determinados intervalos pode ser devida à destruição das células (isto é, de espermatócitos e/ou espermatogónias).

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Quando for possível, as substâncias a testar serão dissolvidas ou colocadas em suspensão numa solução salina isotónica. As substâncias químicas insolúveis na água podem ser dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados. O veículo utilizado não deverá interferir com a substância a testar nem deverá produzir efeitos tóxicos. Serão utilizadas preparações frescas da substância a testar.

Condições experimentais

Via de administração

A substância a testar deverá ser administrada uma única vez. Pode ser utilizado um programa de tratamento repetido em função das informações toxicológicas disponíveis. As vias de administração habituais são a intubação oral ou a injecção interperitoneal. Podem ser adequadas outras vias de administração.

Animais de experiência

Recomenda-se a utilização de ratos ou ratinhos. Repartem-se ao acaso entre os grupos tratados e de controlo animais jovens e sãos tendo atingido a plena maturidade sexual.

Número e sexo

Utiliza-se um número adequado de machos tratados, tendo em conta a frequência espontânea da característica biológica que está a ser avaliada. O número escolhido deverá basear-se numa sensibilidade de detecção e grau de significação pré-estabelecidos. Por exemplo, num teste típico, o número de machos escolhido para cada grupo de dose deverá ser suficientemente grande para obter 30 a 50 fêmeas grávidas por período de acasalamento.

Utilização de controlos negativos e positivos

Deverão ser incluídos em cada experiência controlos positivos e negativos (veículos) sendo geralmente simultâneos. Se experiências recentes efectuadas no mesmo laboratório tiverem dado resultados aceitáveis com os controlos positivos, estes resultados poderão ser utilizados em vez dum controlo positivo simultâneo. No que respeita às substâncias de controlo positivo deverá utilizar-se uma dose baixa apropriada (por exemplo MMS, intraperitonealmente, 10 mg/kg) para demonstrar a sensibilidade do teste.

Doses

Normalmente usam-se três níveis de dose diferentes. A dose máxima deverá produzir sinais de toxicidade ou reduzir a fecundidade dos animais tratados. Em alguns casos pode ser suficiente uma única dose elevada.

Ensaio limite

As substâncias não tóxicas são testadas à razão de 5 g/kg no caso de administração única e de 1 g/kg/dia no caso de administração repetida.

Procedimento

Vários esquemas de tratamento são possíveis. O método mais frequente é o da administração única. Podem utilizar-se outros esquemas de tratamento.

Cada macho é acasalado sequencialmente com uma ou duas fêmeas virgens não tratadas, a intervalos de tempo apropriados após o tratamento. As fêmeas deverão ser deixadas com os machos durante pelo menos um ciclo completo do estro, ou até que o acasalamento seja comprovado pela presença de esperma na vagina ou pela presença de um rolhão vaginal.

O número de acasalamentos após tratamento é determinado pelo esquema de tratamento e deverá assegurar que sejam testados todos os estádios das células germinais tratadas.

As fêmeas são sacrificadas durante a segunda metade da gestação e o conteúdo do útero é examinado para determinação do número de implantes vivos e mortos. Os ovários podem ser examinados para determinar o número de corpos amarelos.

2. **RESULTADOS**

Os resultados deverão ser apresentados em quadros, indicando o número de machos, o número de fêmeas grávidas bem como o número de fêmeas não grávidas. Os resultados de cada acasalamento incluindo a identidade de cada macho e de cada fêmea são apresentados separadamente. Serão descritos para cada fêmea a semana de acasalamento e a dose recebida pelos machos, bem como a frequência dos implantes vivos e mortos.

O cálculo do efeito total de letalidade dominante baseia-se numa comparação do número de implantes vivos por fêmea no grupo tratado com o número de implantes vivos por fêmea no grupo de controlo. Compara-se a relação implantes vivos/mortos no grupo tratado com a mesma relação no grupo de controlo para indicação das perdas pós-implantação.

Se os resultados forem registados sob a forma de mortalidades precoces e mortalidades tardias, os quadros deverão tornar clara essa diferença. Se for avaliada a perda anterior à implantação, devem apresentar-se os resultados. Esta perda pode ser calculada como a discrepância entre o número de corpos amarelos e o número de implantes ou como a diminuição do número médio de implantes por fêmea em relação ao dos acasalamentos de controlo. Os resultados serão avaliados com métodos estatísticos apropriados.

3. RELATÓRIO

3.1. **Relatório do teste**

O relatório do teste deverá incluir as informações seguintes:

— espécies, estirpe, idade e peso dos animais utilizados, número de animais de cada sexo nos grupos tratados e de controlo,

— substância a testar, veículo, doses testadas e justificação da escolha das doses, controlos negativos e positivos, dados relativos à toxicidade,

— via de administração e esquema do tratamento,

— esquema de acasalamento,

— método utilizado para comprovar o acasalamento,

— momento do sacrifício,

— critérios de contagem dos efeitos de letalidade dominante,

— relação dose/resposta, se possível,

— avaliação estatística,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

CITOGENÉTICA DE CÉLULAS GERMINAIS DE MAMÍFERO — *IN VIVO*

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do metódo de ensaio

Este teste citogenético *in vivo* detecta aberrações cromossómicas estruturais em espermatogónias. Consiste na análise de mitoses de espermatogónias para detecção de aberrações de tipo cromatídico e cromossómico.

O método utiliza preparações de testículo de mamíferos expostos aos produtos químicos a testar, pelas vias apropriadas, e sacrificados a intervalos de tempo diversos. Os animais são ainda tratados antes de serem sacrificados com inibidores do fuso como a colchicina para acumular células num estádio da mitose metafase-*like* (c-metafase). Efectuam-se preparações de cromossomas com secagem ao ar, sendo depois coradas e analisadas ao microscópio.

A análise de espermatócitos na diacinese-metafase I para a detecção de multivalentes de translocação, após tratamento das *stem-cells* das espermatogónias, pode fornecer informações complementares úteis.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Os produtos químicos a testar são dissolvidos numa solução salina isotónica. As substâncias insolúveis são dissolvidas ou colocadas em suspensão num veículo apropriado. São utilizadas soluções preparadas de fresco da substância a testar. Se for utilizado um veículo para facilitar a administração este não deve interferir com o produto químico a testar ou produzir efeitos tóxicos.

Via de administração

Os produtos químicos a testar devem, de um modo geral, ser administrados uma única vez. Pode utilizar-se um esquema de administração repetida, se tal for baseado em informações toxicológicas. No entanto o tratamento repetido pode apenas ser aplicado se a substância a testar não apresentar efeitos citotóxicos maiores sobre espermatogónias em diferenciação.

As vias habituais de administração são a oral e a injecção intraperitoneal. Podem ser adequadas outras vias de administração.

Animais de experiência

Utilizam-se mais frequentemente o ratinho e o hamster chinês. Pode ser utilizada qualquer outra espécie de mamífero.

Usam-se machos sexualmente maduros, sendo repartidos ao acaso pelos grupos de experiência e de controlo.

Número de animais

São utilizados pelo menos cinco machos por grupo de experiência e de controlo.

Uso de controlos negativos e positivos

Deverão ser incluídos controlos positivos e negativos (veículo) simultâneos, em cada experiência.

As substâncias de controlo positivo deverão ser utilizadas numa dose mínima adequada para demonstrar a sensibilidade do teste (por exemplo: mitomicina C, intraperitonealmente, à razão de 0,3 mg/kg).

Doses

Utiliza-se uma única dose da substância a testar, sendo essa a dose máxima tolerada ou então produzindo alguns sinais de toxicidade. Se esta dose provocar a destruição de um grande número de células deverá utilizar-se uma dose mais baixa produzindo citotoxicidade. Se for necessário determinar uma relação dose/resposta serão utilizadas pelo menos três doses (por exemplo: para confirmar uma resposta ligeiramente positiva). As substâncias não tóxicas são testadas com a dose máxima praticável, tanto no caso da administração única como no da repetida.

Procedimento

Em geral, a substância a testar é administrada aos animais apenas uma vez. No grupo exposto à dose máxima recolhem-se amostras em três ocasiões após o tratamento. A colheita central é feita após 24 horas. Como a cinética do ciclo celular pode ser influenciada pela substância testada, a primeira colheita e a última têm lugar, com intervalos apropriados, num prazo de 6 a 48 horas depois da administração da substância. Quando se utilizarem doses suplementares, recolhem-se amostras durante a fase particularmente sensível ou, quando esta não for conhecida, 24 horas depois do tratamento.

Em alternativa pode aplicar-se um esquema de administração repetida. Neste caso os animais são sacrificados 24 horas depois do último tratamento. Podem recolher-se amostras adicionais entre 6 e 24 depois do último tratamento.

Preparação dos testículos

Para analisar as mitoses das espermatogónias injecta-se nos animais por via intraperitoneal uma dose apropriada de um inibidor do fuso como a colchicina. Os animais são sacrificados em seguida após um intervalo apropriado. No caso do ratinho este varia entre três a cinco horas; para o hamster chinês pode ser superior a cinco horas.

O método utilizado é o da secagem ao ar. Consoante a espécie pode tornar-se necessário modificar o método *standard*. Obtêm-se as suspensões celulares, tratam-se com uma solução hipotónica, sendo depois fixadas. As células são estendidas em lâminas e coradas. As lâminas são codificadas antes de serem analisadas ao microscópio.

Análise

São analisadas pelo menos 100 metafases mitóticas de boa qualidade e com o número completo de centrómeros para se detectarem aberrações cromossómicas estruturais. Além disso, pode determinar-se a taxa de mitoses das espermatogónias em relação à primeira e à segunda metafase meióticas numa amostra total de 100 células em divisão por animal, com o fim de evidenciar um eventual efeito citotóxico.

2. RESULTADOS

Os resultados deverão ser apresentados em quadros. Registar-se-ão separadamente todos os tipos de aberração para cada animal tratado e de controlo. Serão incluídos o número total de células analisadas e o número total de células aberrantes por grupo. Serão indicados a média e o desvio padrão para todos os parâmetros. No caso de terem sido determinadas a taxa média das mitoses das espermatogónias em relação à primeira e à segunda metafase meiótica, estas serão apresentadas num quadro para cada grupo de experiência e de controlo.

Os resultados são avaliados com métodos estatísticos apropriados.

3. **RELATÓRIO**

3.1. **Relatório do teste**

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

— espécie e estirpe dos machos, idade e peso dos machos,

— número de animais de cada grupo de experiência e de cada grupo de controlo,

— condições experimentais, descrição pormenorizada do tratamento, doses, solventes, inibidor do fuso utilizado,

— número de células analisadas por animal em cada grupo,

— tipo e número de aberrações para cada animal tratado e de controlo indicadas separadamente,

— avaliação estatística,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

TESTE DAS MALHAS *(SPOT-TEST)* NO RATINHO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

Este teste é uma prova *in vivo* efectuada no ratinho, cujos embriões em desenvolvimento são expostos à substância a testar. As células visadas dos embriões em desenvolvimento são os melanoblastos e os genes alvo são os responsáveis pela pigmentação do pêlo. Os embriões em desenvolvimento são heterozigóticos para alguns desses genes. Uma mutação ao nível do alelo dominante ou a perda do alelo dominante de um desses genes num melanoblasto (na sequência de vários fenómenos genéticos) traduz-se pela expressão do fenótipo recessivo nas células que dele descendem, do que resulta o aparecimento de uma malha de cor diferente no pêlo do ratinho. Conta-se assim o número de descendentes portadores de malhas (mutações) e a sua frequência é comparada com a frequência observada na descendência resultante do desenvolvimento de embriões tratados apenas com o solvente. O teste das malhas no ratinho (*spot test*) detecta as mutações somáticas presumíveis nas células fetais.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

Quando for possível as substâncias a testar são dissolvidas ou colocadas em suspensão numa solução salina isotónica. As substâncias insolúveis na água serão dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados. O veículo utilizado não deverá interferir com a substância a testar nem produzir efeitos tóxicos. Deverão utilizar-se soluções preparadas de fresco da substância a testar.

Animais de experiência

Ratinhos da estirpe T (*nonagouti*, a/a; *chinchilla*, *pink eye*, $c^{ch}p/c^{ch}p$; *brown*, b/b; *dilute, short ear*, d se/d se; *piebald spotting*, s/s) são acasalados seja com a estirpe HT (*pallid, nonagouti, brachypody*, pa a bp/pa a bp; *leaden fuzzy*, ln fz/ln fz; *pearl* pe/pe) ou com a C57 BL (*nonagouti*, a/a). Podem utilizar-se outros cruzamentos apropriados como entre a NMRI (*nonagouti*, a/a; albino, c/c) e a DBA (*nonagouti*, a/a; *brown*, b/b; *dilute*, d/d) na condição de produzirem uma descendência *nonagouti*.

Número e sexo

Deve tratar-se um número suficiente de fêmeas grávidas de forma a obter um número adequado de descendentes vivos para cada dose utilizada. A dimensão da amostra depende do número de malhas observadas nos ratinhos tratados bem como da importância dos dados dos controlos. Só se aceitará um resultado negativo se forem examinados pelo menos 300 descendentes das fêmeas tratadas com a dose máxima.

Controlos negativos e positivos

Deverá dispor-se de dados de controlo simultâneos respeitantes aos ratinhos tratados apenas com o veículo (controlos negativos). Dados de controlo de experiências anteriores provenientes do mesmo laboratório podem

ser-lhes reunidos para se aumentar a sensibilidade do teste, no caso destes serem homogéneos. Se a substância testada não se revelar mutagénica, deveriam estar disponíveis os dados obtidos recentemente pelo mesmo laboratório para um controlo positivo cuja acção mutagénica nesta prova seja conhecida.

Via de administração

As vias de administração habituais nas fêmeas grávidas são a intubação oral e a injecção intraperitoneal. Tratamentos por inalação ou outras vias de administração serão usados quando tal for apropriado.

Doses

Utilizam-se pelo menos dois níveis de dose, um dos quais provocando sinais de toxicidade ou reduzindo o tamanho das ninhadas. No caso de substâncias não tóxicas, recorrer-se-á a um tratamento com a dose máxima praticável.

Procedimento

Administra-se normalmente um tratamento único no dia 8, 9 ou 10 de gestação, sendo o dia 1 aquele em que se observe pela primeira vez a presença de um rolhão vaginal. Estes dias correspondem 7,25, 8,25 e 9,25 dias após a concepção. Podem ser efectuados tratamentos sucessivos durante esses dias.

Análise

Três a quatro semanas após o nascimento a descendência é codificada e examinada para se detectar a presença de malhas. Distinguem-se três classes de malhas:

a) Malhas brancas situadas a menos de 5 mm da linha médio-ventral que se presuma resultarem de morte celular (WMVS);

b) Malhas amarelas de tipo agouti, associadas aos mamilos, aos orgãos genitais, à garganta, às regiões axilar e inguinal bem como no meio da região frontal, que se presuma serem devidas a uma diferenciação defeituosa (MDS); e

c) Malhas pigmentadas e brancas, distribuídas ao acaso no pêlo, que se presuma serem devidas a mutações somáticas (RS).

Contam-se as três classes mas apenas a última, isto é, a RS, tem relevância genética. Os problemas postos pela distinção entre as classes MDS e RS podem ser resolvidos examinando-se amostras de pêlos ao microscópio de fluorescência.

Serão anotadas as alterações macroscópicas evidentes observadas na descendência.

2. RESULTADOS

Os resultados são apresentados indicando o número total de crias examinadas e o número de crias apresentando uma ou várias malhas que se presuma serem devidas a uma mutação somática. Os resultados relativos aos animais tratados e aos controlos negativos são comparados por métodos apropriados. Os resultados são apresentados igualmente referindo-se a ninhada como unidade.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

— as estirpes utilizadas no cruzamento,

— o número de fêmeas grávidas nos grupos tratados e de controlo,

— o tamanho médio das ninhadas nos grupos tratados e de controlo na ocasião do nascimento e do desmame,

— as doses da substância a testar,

— o solvente utilizado,

— o dia da gestação em que se administrou o tratamento,

— a via de administração,

— o número total de crias observadas bem como o número das que apresentavam malhas WMVS, MDS e RS nos grupos tratados e de controlo,

— alterações morfológicas macroscópicas,

— relação dose/efeito se possível,

— avaliação estatística,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. **Avaliação e interpretação**

Ver Introdução geral, Parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução geral, Parte B.

TRANSLOCAÇÃO HEREDITÁRIA NO RATINHO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Ver Introdução geral, Parte B.

1.2. Definição

Ver Introdução geral, Parte B.

1.3. Substâncias de referência

Nenhuma.

1.4. Princípio do método de ensaio

O teste de translocação hereditária no ratinho detecta alterações cromossómicas estruturais e numéricas nas células germinais de mamífero que são postas em evidência na descendência da primeira geração. Os tipos de alterações cromossómicas detectadas são as translocações recíprocas e, se for incluída a descendência do sexo feminino, a perda do cromossoma X. Os portadores de translocações e as fêmeas XO apresentam uma fertilidade reduzida, permitindo a selecção de uma descendência F_1 para análise citogenética. Alguns tipos de translocação provocam esterilidade total (X-autossoma e tipo c-t). As translocações são observadas por métodos citogenéticos nas células meióticas na diacinese-metafase I de indíviduos do sexo masculino, sejam machos F_1 ou filhos de fêmeas F_1. As fêmeas XO são identificadas citogeneticamente pela presença de apenas 39 cromossomas nas mitoses da medula óssea.

1.5. Critérios qualitativos

Nenhum.

1.6. Descrição do método de ensaio

Preparativos

As substâncias a testar são dissolvidas numa solução salina isotónica. Se forem insolúveis na água serão dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados. Utilizam-se soluções preparadas de fresco da substância a testar. Se se utilizar um veículo para facilitar a administração este não deve interferir com a substância a testar nem produzir efeitos tóxicos.

Via de administração

As vias de administração são habitualmente a intubação oral ou a injecção intraperitoneal. Podem ser adequadas outras vias de administração.

Animais de experiência

Estas experiências são efectuadas em ratinhos para facilitar a reprodução e a verificação citológica. Não é requerida nenhuma estirpe específica. No entanto, o número médio de crias por ninhada da estirpe utilizada deverá ser superior a oito e ser relativamente constante. Serão utilizados animais sãos tendo já atingido a maturidade sexual.

Número de animais

O número de animais necessários depende da frequência de translocações espontâneas bem como da taxa de indução nínima requerida para um resultado positivo.

O teste consiste habitualmente na análise da descendência masculina F_1. Serão testados pelo menos 500 descendentes masculinos F_1 por cada dose. Se se incluir a descendência feminina F_1 serão necessários 300 machos e 300 fêmeas.

Controlos negativos e positivos

Devem estar disponíveis dados de controlo adequados provenientes de provas realizadas simultâneamente ou de experiências anteriores. Quando existirem dados aceitáveis de controlos positivos provenientes de experiências efectuadas recentemente no mesmo laboratório, estes podem ser utilizados em vez de controlos positivos simultâneos.

Doses

É testada apenas uma dose, tratando-se habitualmente da dose máxima associada à produção de efeitos tóxicos mínimos mas não afectanto o comportamento reprodutor nem a sobrevivência. Para estabelecer uma relação dose/resposta são necessárias duas doses adicionais, mais baixas. No caso de substâncias não tóxicas, deverá recorrer-se a uma exposição à dose máxima praticável.

Procedimento

Tratamento e acasalamento

São possíveis dois esquemas de tratamento. A administração única da substância a testar é o método mais frequente. A substância a testar pode também ser administrada sete dias por semana durante 35 dias. O número de acasalamentos depois do tratamento é determinado pelo esquema de tratamento e será tal que todos os estádios de células germinais sejam implicados. No fim do período de acasalamento as fêmeas são colocadas em gaiolas individuais. Quando as fêmeas parirem registar-se-ão a data, o número de crias da ninhada e o sexo das crias. Toda a descendência do sexo masculino é desmamada e toda a do sexo feminino afastada a não ser que esteja incluída na experiência.

Pesquisa dos heterozigóticos de translocação

É utilizado um de dois métodos disponíveis:

— análise da fertilidade da descendência F_1 e verificação ulterior de eventuais portadores de translocações por análise citogenética,

— análise citogenética de todos os machos F_1 sem selecção prévia por verificação da fertilidade.

a) Análise da fertilidade

A diminuição de fertilidade de um indivíduo F_1 pode ser determinada observando-se o número de crias da ninhada e/ou analisando o conteúdo uterino das fêmeas com que acasalou.

Deverão estabelecer-se critérios para determinação da fertilidade normal e diminuída da estirpe de ratinhos utilizada.

Observação do número de animais por ninhada: os machos F_1 a testar são colocados em gaiolas individuais com fêmeas provenientes da mesma experiência ou da colónia. As gaiolas são inspeccionadas diariamente a partir do dia 18 após o acasalamento. O número de crias da ninhada e o sexo da descendência F_2 são registados na ocasião do nascimento, sendo as crias eliminadas em seguida. Se se testar a descendência do sexo feminino F_1 então os descendentes F_2 provenientes de ninhadas pequenas são conservados com vista a uma análise mais profunda. As fêmeas portadoras de uma translocação serão objecto de uma verificação por análise citogenética de uma translocação em qualquer dos seus descendentes machos. As fêmeas XO são identificadas pela alteração da razão macho/fêmea na sua descendência que passa de $^1/_1$ para $^1/_2$ machos/fêmeas. Num método sequencial os animais F_1 normais não serão objecto de outra verificação se a primeira ninhada F_2 atingir ou ultrapassar um valor normal pré-estabelecido, senão observar-se-á uma segunda ou uma terceria ninhadas F_2.

Os animais F_1 que não puderem ser classificados como normais após uma observação de até três ninhadas F_2 no máximo, serão submetidos seja a um novo controlo por análise do conteúdo uterino das fêmeas com que acasalaram, seja submetidos directamente a uma análise citogenética.

Análise do Conteúdo Uterino: a redução do número de crias por ninhada nos portadores de translocação é devida à morte de embriões, de modo que um grande número de implantes mortos indica a presença de uma translocação no animal submetido ao teste. Cada macho F_1 a testar é acasalado com duas ou três fêmeas. A concepção é confirmada pela inspecção matinal diária das fêmeas para detectar a presença de rolhão vaginal. As fêmeas são sacrificadas 14 a 16 dias mais tarde registando-se o número de implantes vivos e mortos presentes nos seus úteros.

b) Análise citogenética

As preparações de testículo são efectuadas pelo método de secagem ao ar. Os portadoras de translocações são identificados pela presença de configurações multivalentes na diacinese-metafase I nos espermatócitos primários. A observação de pelo menos duas células apresentando uma associação multivalente constitui a prova necessária de que o animal testado é portador de uma translocação.

Se não tiver sido efectuada nenhuma selecção por análise de fertilidade, todos os machos F_1 são submetidos a um exame citogenético. Devem ser analisadas ao microscópio um mínimo de 25 células em diacinese-metafase I por macho. É necessário o exame das metafases mitóticas nas espermatogónias ou na medula óssea, no caso dos machos tendo testículos pequenos ou apresentando uma paragem meiótica antes da diacinese ou no caso das fêmeas F_1 suspeitas de serem XO. A presença de um cromossoma anormalmente longo e/ou curto em alguma de 10 células é a prova duma translocação particular acarretando a esterilidade do macho (tipo c-t). Algumas translocações X-autossoma provocando a esterilidade do macho podem apenas ser identificadas por uma análise de bandas de cromossomas mitóticos. A presença de 39 cromossomas em 10 mitoses por cada 10 é a prova de um estado XO numa fêmea.

2. RESULTADOS

Os resultados são apresentados sob a forma de quadros.

O número médio de crias por ninhada e a razão entre os sexos são registados à nascença e no desmame para cada período de acasalamento.

Quando da avaliação da fertilidade dos animais F_1 deverão apresentar-se o número médio de crias por ninhada das ninhadas resultantes de todos os acasalamentos normais bem como o número de crias individual das ninhadas provenientes de animais F_1 portadores de translocação. No que respeita à análise do conteúdo uterino serão anotados o número médio de implantes vivos e mortos resultantes de acasalamentos normais e o número de implantes vivos e mortos para cada acasalamento de animais portadores de translocação.

Quando da análise citogenética da diacinese-metafase I, serão registados os diferentes tipos de configurações multivalentes e o número total de células para cada portador de translocação.

Para os indivíduos F_1 estéreis serão indicados o número total de acasalamentos e a duração do período de acasalamento. Serão indicados o peso dos testículos bem como os pormenores da análise citogenética.

Para as fêmeas XO indicar-se-á o número de crias médio por ninhada, a razão entre os sexos na descendência F_2, bem como os resultados da análise citogenética.

Se forem seleccionados eventuais portadores de translocação F_1 por testes de fertilidade os quadros deverão mencionar quantos deles foram confirmados como sendo heterozigóticos de translocação.

Serão apresentados os dados relativos aos controlos negativos bem como as experiências de controlo positivo.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do teste

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

— estirpe de ratinho utilizada, idade dos animais, peso dos animais tratados,

— número de animais progenitores de cada sexo nos grupos tratados e de controlo,

— condições experimentais, descrição pormenorizada do tratamento, doses, solventes, esquema de acasalamento,

— número e sexo de crias por fêmea, número e sexo das crias mantidas para uma análise de translocação,

— momento e critérios da análise de translocação,

— número e descrição pormenorizada dos portadores de translocação, incluindo dados relativos à reprodução e ao conteúdo uterino, se possível,

— métodos citogenéticos e pormenores da análise microscópica, de preferência com fotografias,

— avaliação estatística,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. Avaliação e interpretação

Ver Introdução geral, Parte B.

4. REFERÊNCIAS

Ver Introdução geral, Parte B.

PARTE C: MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ECOTOXICIDADE

INTRODUÇÃO GERAL: PARTE C

Os métodos de ensaio a seguir descritos destinam-se à determinação de algumas das propriedades ecotoxicológicas enumerados no Anexo VIII da Directiva 79/831/CEE. Os notificadores devem ter conhecimento de que não se encontram incluídos no texto os métodos para a determinação das seguintes propriedades previstas no Nível 1 do Anexo VIII:

— estudo de toxicidade prolongada com *Daphnia magna*,

— ensaio numa planta superior,

— estudo de toxicidade prolongada com peixes,

— ensaios de acumulação numa espécie.

Logo que sejam incluídos os métodos de ensaio adequados para a determinação destas propriedades, não publicados sob a forma de uma nova adaptação ao progresso técnico. Entretanto, os notificadores devem utilizar métodos adequados, internacionalmente reconhecidos, que devem ser nomeados à autoridade competente.

ENSAIO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DAS ALGAS

1. MÉTODO

1.1. Introdução

O objectivo do presente ensaio é determinar os efeitos de uma dada substância no crescimento de espécies de algas verdes unicelulares. Ensaios relativamente curtos permitem avaliar efeitos ao longo de várias gerações. O presente método pode ser adaptado a diferentes espécies de algas unicelulares, e, neste caso, deve ser fornecida uma descrição do método utilizado com o relatório do ensaio.

O presente método aplica-se mais facilmente a substâncias solúveis em água que, nas condições do ensaio, são susceptíveis de permanecerem na água.

Para as substâncias com uma solubilidade limitada no meio do ensaio pode não ser possível determinar quantitativamente a CE_{50} (ver definição abaixo).

O presente método pode ser utilizado para substâncias que não interfiram directamente com a medição do crescimento das algas.

Quando se efectua este ensaio, podem ser úteis as seguintes informações:

— solubilidade na água,

— pressão de vapor,

— fórmula de estrutura,

— pureza da substância,

— estabilidade química na água e à luz,

— métodos de análise quantitativa da substância na água,

— valor pka,

— coeficiente de partição n-Octanol/água,

— resultados de um ensaio preliminar de biodegradação.

1.2. Definições e unidades

Concentração celular: o número de células por ml; crescimento: o aumento da concentração celular ao longo do período de ensaio; taxa de crescimento: o aumento da concentração celular por unidade de tempo.

CE_{50}: no presente método, a concentração da substância de ensaio que provoca uma redução de 50 % quer no crescimento quer na taxa de crescimento em relação ao controlo.

CSEO (concentração sem efeito observável): no presente método, a mais elevada concentração ensaiada com a qual, para o(s) parâmetro(s) medido(s) não se verificou qualquer inibição significativa do crescimento em relação aos valores do controlo.

1.3. Substâncias de referência

Uma substância de referência pode ser utilizada para detectar condições de ensaio não satisfatórias. Se se utilizar uma substância de referência, os resultados devem ser apresentados no relatório do ensaio. Como substância de referência, pode-se utilizar o dicromato de potássio.

1.4. Princípio do método de ensaio

Culturas de algas verdes seleccionadas, em fase de crescimento exponencial, são expostas em condições definidas, a diferentes concentrações da substância de ensaio, durante diversas gerações. Ao longo de um período fixado, determina-se a inibição do crescimento em relação à cultura controlo.

1.5. **Critérios de qualidade**

1.5.1. *Condições de valiade do ensaio*

A concentração celular nas culturas controlo deverá aumentar pelo menos 16 vezes no espaço de três dias.

O desaparecimento da substância de ensaio da água devido à sua fixação na biomassa não invalida necessariamente o ensaio.

1.6. **Descrição do método de ensaio**

1.6.1. *Preparações*

1.6.1.1. Equipamento e materiais

— equipamento normal de laboratório,

— frascos de ensaio de volume adequado (por exemplo, são adequados Erlenmeyers de 250 ml quando o volume da solução de ensaio é de 100 ml),

— aparelhagem destinada à cultura: estufa ou câmara em que pode ser mantido o intervalo de temperatura de 21 a 25 °C ± 2 °C e fornecida uma iluminação uniforme contínua de comprimento de onda de 400 a 700 nm (recomenda-se um fluxo quântico de $0{,}72 \times 10^{20}$ fotões/m^2.s ± 20 %. Este fluxo quântico é equivalente a 120 µE/m^2.s e pode ser obtido com lâmpadas universais fluorescentes brancas (temperatura da luz de cerca de 4 200 K), produzindo aproximadamente 8 000 Lux, medidos com um colector esférico,

— aparelhagem para a determinação das concentrações celulares, por exemplo um contador de partículas electrónico, microscópio com uma câmara de contagem, fluorímetro, espectrofotómetro, colorímetro (nota: para que se possam obter medições úteis para baixas concentrações celulares quando se utiliza um espectrofotómetro, pode ser necessário usar *cuvettes* com uma espessura de pelo menos 4 cm).

1.6.1.2. Meio de cultura para as algas

Recomenda-se o seguinte meio:

NH_4Cl:	15	mg/l,
$MgCl_2.6H_2O$:	12	mg/l,
$CaCl_2.2H_2O$:	18	mg/l,
$MgSO_4.7H_2O$:	15	mg/l,
KH_2PO_4:	1,6	mg/l,
$FeCl_3.6H_2O$:	0,08	mg/l,
$Na_2EDTA.2H_2O$:	0,1	mg/l,
H_3BO_3:	0,185	mg/l,
$MnCl_2.4H_2O$:	0,415	mg/l,
$ZnCl_2$:	3×10^{-3}	mg/l,
$CoCl_2.6H_2O$:	$1{,}5 \times 10^{-3}$	mg/l,
$CuCl_2.2H_2O$:	10^{-5}	mg/l,
$Na_2MoO_4.2H_2O$:	7×10^{-3}	mg/l,
$NaHCO_3$:	50	mg/l.

Quando o meio entra em equilíbrio com o ar, o seu pH é aproximadamente 8.
A recomendação anterior não obsta à utilização de outros meios de cultura que respeitem, contudo, os seguintes limites para os constituintes essenciais:

P:	⩽ 0,7	mg/l,
N:	⩽ 10	mg/l,
quelantes:	⩽ 10^{-3}	mmol/l,
dureza (Ca + Mg):	⩽ 0,6	mmol/l.

O meio de cultura recomendado e o meio indicado na referência (1) satisfazem esta exigência.

1.6.1.3. Organismos utilizados no ensaio

Selecção das espécies

Sugere-se que se utilizem espécies de algas verdes de crescimento rápido, adequadas para o processo de cultura e ensaio. Consideram-se adequadas as seguintes espécies:

— *Selenastrum capricornutum* ATCC 22662,

— *Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG,

— *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11 b.

Se se utilizarem outras espécies, deve ser referida a variedade.

1.6.1.4. Protocolo experimental

Concentração celular inicial

Recomenda-se que a concentração celular inicial nas culturas de ensaio seja aproximadamente de 10^4 células/ml relativamente à *Selenastrum capricornutum* e *Scenedesmus subspicatus*. Quando se utilizam outras espécies a biomassa deve ser equivalente.

Concentrações da substância de ensaio

A gama de concentrações em que é provável que se produzam efeitos, é determinada com base nos resultados provenientes dos ensaios de determinação das ordens de grandeza de concentrações.

Para tal ensaio, devem ser seleccionadas pelo menos cinco concentrações segundo uma série geométrica. A mais baixa concentração ensaiada não deve provocar qualquer efeito observável no crescimento das algas. A mais elevada concentração ensaiada deve inibir pelo menos 50 % o crescimento em relação à cultura de controlo e de preferência, provocar a paragem completa do crescimento.

Repetições e controlos

O protocolo do ensaio deve incluir, de preferência, três repetições de cada concentração ensaiada e, no ideal o dobro do número de controlos. Se tal se justificar, o protocolo experimental pode ser alterado no sentido de aumentar o número de concentrações e reduzir o número de repetições por concentração.

Quando se utiliza um veículo para solubilizar a substância de ensaio, devem ser incluídas no protocolo experimental controlos suplementares contendo o veículo nas mais elevadas concentrações utilizadas nas culturas de ensaio.

1.6.2. *Execução do ensaio*

A presente secção inclui indicações para o estudo de substâncias facilmente solúveis, substâncias dificilmente solúveis e substâncias voláteis.

1.6.2.1. Ensaio de substâncias facilmente solúveis em água

Para preparar as culturas de ensaio contendo as concentrações desejadas da substância de ensaio e a quantidade desejada de inóculo de algas diluem-se as alíquotas da solução-mãe da substância de ensaio e a suspensão de algas com o meio de algas filtrado.

Os frascos de cultura são agitados e colocados no aparelho destinado à cultura. No decurso de ensaio é necessário manter as algas em suspensão e facilitar a transferência de CO_2. Com esse objectivo pode-se proceder ao agitamento ou arejamento do meio. As culturas devem ser mantidas a uma temperatura entre 21 a 25 °C, controlada a ± 2 °C.

Determina-se a concentração celular em cada frasco pelo menos 24, 48 e 72 horas após o início do ensaio. Utiliza-se o meio de algas filtrado na determinação do branco quando se utilizam contadores de partículas ou quando se utilizam espectrofetómetros.

O pH é medido no início do ensaio e após 72 horas. O pH das soluções não deve variar, normalmente, de mais de uma unidade durante o ensaio.

1.6.2.2. Ensaio de substâncias com solubilidade limitada em água

Quando a solubilidade da substância de ensaio é da ordem de grandeza da maior concentração utilizada no ensaio apenas são necessários ligeiros desvios relativamente ao procedimento acima descrito na preparação das soluções de ensaio. Uma solução saturada pode servir como solução-mãe da substância de ensaio. Um outro método pode consistir em dissolver a substância de ensaio na concentração desejada no meio de algas, antes de adicionar a suspensão destas.

As soluções-mãe de substância com baixa solubilidade em água podem ser preparadas através de dispersão mecânica ou utilizando veículos de baixa toxicidade para as algas, tais como solventes orgânicos, emulsionantes ou dispersantes. Sempre que se utilizar um veículo a sua concentração não deve ultrapassar 100 mg/l e no protocolo de ensaio devem ser incluídos controlos adicionais nos quais se adiciona o veículo na mais elevada concentração presente nas soluções de ensaio.

1.6.2.3. Ensaio de substâncias voláteis

Até ao presente, não existe qualquer método genericamente aceite para ensaiar substâncias voláteis. Quando se sabe que uma substância tem tendência para se vaporizar, podem utilizar-se frascos de ensaio fechados, com maior espaço vazio. Foram propostas variantes ao presente método [ver referência (1)].

Deve-se procurar determinar a quantidade de substância que permanece nas soluções e aconselha-se extrema precaução na interpretação dos resultados dos ensaios com produtos químicos voláteis quando se usam sistemas fechados.

2. RESULTADOS E AVALIÇÃO

As concentrações celulares medidas nas culturas do ensaio e controlo são apresentadas em quadros conjuntamente com as concentrações da substância de ensaio e os tempos de medição. O valor médio da concentração celular para cada uma das concentrações da substância de ensaio e para os controlos é representado graficamente em função do tempo, obtendo-se deste modo curvas de crescimento.

Para determinar a relação concentração/efeito devem ser utilizados os dois métodos seguintes:

2.1. **Comparação das áreas abaixo das curvas de crescimento**

A área existente abaixo das curvas de crescimento pode ser calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

em que:

A = área,
N_0 = número nominal de células/ml no instante t_0,
N_1 = número de células/ml contadas no instante t_1,
N_n = número de células/ml contadas no instante t_n,
t_1 = tempo da primeira medição após o início do ensaio,
t_n = tempo de medição n após o início do ensaio.

A percentagem de inibição do crescimento celular para cada uma das concentrações da substância de ensaio (I_A) calcula-se como a diferença entre a área situada abaixo da curva de crescimento do ensaio de controlo (A_c) e a área abaixo da curva de crescimento verificada para cada uma das concentrações da substância de ensaio (A_t) segundo a fórmula:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

Os valores I_A representam-se graficamente em papel semilogarítmico ou em papel semilogarítmico *probit* em função das correspondentes concentrações. Se os pontos são representados graficamente em papel *probit* traça-se uma recta por estimativa, ou quando se pode considerar que existe uma distribuição *log-normal* do valores pode-se calcular a recta de regressão.

O valor CE_{50} resulta da intersecção da recta (de regressão) com a paralela ao eixo das abcissas no ponto $I_A = 50\,\%$. Para designar o valor obtido por este método de cálculo sem ambiguidade, propõe-se a utilização do símbolo C_bE_{50}. Em relação ao presente método de ensaio que determina medições às 24, 48 e 72 horas, o símbolo passa a ser C_bE_{50} (0 – 72h).

A representação gráfica de I_A em função do logarítmo das concentrações pode igualmente permitir a obtenção de outros valores de CE, tal como C_bE_{10}.

2.2. **Comparação das taxas de crescimento**

A taxa de crescimento específica média (μ) para culturas em crescimento exponencial pode ser calculada do seguinte modo:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

Outro método para calcular a taxa de crescimento específica média consiste em determinar o declive da recta de regressão resultante da representação gráfica de ln N em função do tempo.

A percentagem de redução da taxa de crescimento média para cada uma das concentrações da substância de ensaio comparada com o valor do controlo é representada graficamente em função do logaritmo da concentração. As respectivas CE_{50} podem ser ligadas no gráfico que so obtém deste modo. Para designar sem ambiguidades a CE_{50} obtida por este método, propõe-se a utilização do símbolo C_rE_{50}. Devem ser indicados os tempos de medição, por exemplo, se o valor disser respeito a tempos de observação de 24 a 48 horas, o símbolo será C_rE_{50} (24—48h).

Nota: a taxa de crescimento é um valor logarítmico e pequenas alterações na taxa de crescimento podem conduzir a grandes alterações na biomassa. Os valores da C_bE e C_rE não são, por conseguinte, numericamente comparáveis.

3. **ELABORAÇÃO DO RELATÓRIO**

O relatório do ensaio, deve incluir, se possível, as seguintes informações:

— substâncias de ensaio: dados relativos à identificação química.

— organismos utilizados no ensaio: origem, cultura de laboratório, número de variedade, método de cultura.

— Condições do ensaio:
  — data do início e do termo do ensaio e respectiva duração,
  — temperatura,

— composição do meio,

— aparelho para a cultura,

— pH das soluções no início e no termo de ensaio (deve ser fornecida um explicação, se se observarem desvios de pH superiores a uma unidade,

— veículo e método utilizados para solubilizar a substância de ensaio e concentração do veículo nas soluções de ensaio,

— intensidade e natureza da luz,

— concentrações ensaiadas (medidas ou nominais).

— Resultados:

— concentração celular em cada um dos frascos para cada um dos pontos de medição e método de medição da concentração celular utilizado,

— valores médios das concentrações celulares,

— curvas de crescimento,

— representação gráfica da relação concentração/efeito,

— valores da CE e método de cálculo,

— CSEO,

— outros efeitos observados.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OCDE, Paris 1981, *Test Guideline 201*, Decisão c (81) 30 final do Conselho.

(2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag «Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*», in: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

Apêndice

EXEMPLO DE UM MÉTODO PARA A CULTURA DE ALGAS

Observações gerais

O objectivo do processo de cultura baseado no seguinte método é obter culturas de algas para ensaios de toxicidade.

Devem ser utilizados métodos adequados que garantam que as culturas de algas não sejam contaminadas por bactérias (ISO 4833). Podem ser desejáveis culturas axénicas mas é essencial dispor de culturas de uma única alga.

Todas as operações devem ser efectuadas em condições estéreis a fim de evitar contaminações por bactérias ou outras algas.

Equipamento e materiais

Ver ponto 1.6.1: Preparações e organismos de ensaio.

Métodos para a obtenção de culturas de algas

Preparação de soluções nutritivas (meios)

Todos os sais nutritivos do meio são preparados na forma de soluções concentradas de reserva, que são armazenadas em locais escuros e frescos. Estas soluções são esterilizadas num autoclave ou por filtração.

Prepara-se o meio adicionando a correcta quantidade de solução-mãe de água destilada esterilizada, tendo o cuidado de evitar contaminações. Para um meio sólido, adiciona-se 0,8 % de agar.

Cultura de reserva

As culturas de reserva são pequenas culturas de algas que são regularmente transferidas para um meio fresco a fim de servir de material de ensaio inicial. Se as culturas não forem regularmente utilizadas, faz-se a sua cultura em tubos de agar inclinados. São transferidas para um meio fresco pelo menos de dois em dois meses.

As culturas de reserva são cultivadas em frascos Erlenmeyer contendo o meio adequado (com um volume aproximado de 100 ml). Quando as algas são incubadas a 20 °C com iluminação contínua, é necessária uma transferência semanal.

Na transferência, uma determinada quantidade de cultura «antiga», passa-se com pipetas esterilizadas para um frasco com meio fresco, de modo a que a concentração inicial, para as espécies em crescimento rápido, seja cerca de 100 vezes inferior à verificada na cultura antiga.

A taxa de crescimento de uma espécie pode ser determinada a partir da curva de crescimento. Uma vez conhecida, é possível estimar a densidade em que a cultura deve ser transferida para o novo meio, o que deve ser feito antes da cultura alcançar a fase de morte.

Pré-cultura

Pretende-se que a pré-cultura forneça uma adequada quantidade de algas para a inoculação das culturas de ensaio. A pré-cultura é incubada nas condições do ensaio e utilizada quando ainda se encontra em fase exponencial de crescimento, normalmente após um período de incubação de cerca de três dias. Quando as culturas de algas apresentam células deformadas ou anormais, devem ser rejeitadas.

TOXICIDADE EM RELAÇÃO ÀS MINHOCAS

ENSAIO UTILIZANDO SOLO ARTIFICIAL

1. MÉTODO

1.1. Introdução

Neste ensaio laboratorial, a substância de ensaio é adicionada a um solo artificial no qual são colocadas minhocas durante 14 dias. Após este período (e, facultativamente, após 7 dias) examina-se o efeito letal da substância nas minhocas. O ensaio fornece um método para a avaliação, num prazo relativamente curto, do efeito dos produtos químicos nas minhocas, por absorção via cutânea e alimentar.

1.2. Definição e unidade

CL_{50}: a concentração de uma substância que se considera responsável pela morte de 50 % dos animais de ensaio durante o período de ensaio.

1.3. Substância de referência

É utilizada periodicamente uma substância de referência com o objectivo de demonstrar que a sensibilidade do sistema de ensaio não variou significativamente.

Recomenda-se como substância de referência a cloroacetamida de pureza analítica.

1.4. Princípio do método

O solo constitui um meio variável e, por essa razão, é utilizado neste ensaio um solo franco artificial cuidadosamente definido. As minhocas adultas da espécie *Eisenia foetida* (ver nota em anexo) são mantidas num solo artificial, tratado com diferentes concentrações da substância de ensaio. O conteúdo dos recipientes é espalhado sobre um tabuleiro 14 dias (e facultativamente sete dias) após o início do ensaio e contam-se as minhocas sobreviventes, para cada uma das concentrações.

1.5. Critérios de qualidade

Pretende-se que o ensaio seja o mais reprodutível possível no que diz respeito ao substrato e ao organismo a ensaiar. A mortalidade nos controlos não deve exceder 10 % no termo do ensaio, caso contrário este não é válido.

1.6. Descrição do método de ensaio

1.6.1. *Materiais*

1.6.1.1. Substrato para o ensaio

É utilizado como substrato de base para o ensaio um solo artificial de constituição bem definida.

a) Substrato de base (as percentagens são expressas em termos de peso seco):
   - 10 % de turfa de esfagno (tão próximo quanto possível do pH 5,5—6,0, sem resíduos vegetais visíveis e finamente moído),
   - 20 % de argila caulinítica, de preferência com mais de 50 % de caulinite,
   - cerca de 69 % de areia industrial com quartzo (predominância de areia fina com mais de 50 % de partículas de granulometria 0,05—0,2 mm). Se a substância não for suficientemente dispersível em água é necessário dispor de 10 g por recipiente de ensaio para misturar posteriormente com a substância de ensaio,
   - cerca de 1 % de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) pulverizado e quimicamente puro para ajustar o pH a 6,0 ± 0,5;

b) Substrato para o ensaio

O substrato para o ensaio contem substrato de base, a substância de ensaio e água desionizada. O teor em água deve corresponder a cerca de 25—42 % do peso seco do substrato de base. O teor em água do substrato determina-se por secagem da amostra a 105 °C até se obter um peso constante. O critério-chave é que o solo artificial seja humedecido até à sua saturação. Deve-se proceder à sua mistura cuidadosamente de modo a obter uma distribuição uniforme da substância de ensaio e do substrato. Deve ser referido o modo como é introduzida a substância de ensaio no substrato;

c) Substrato de controlo

O substrato de controlo contém o substrato de base e água. Se se utilizar um aditivo, um substrato de controlo suplementar deverá conter idêntica quantidade do aditivo.

1.6.1.2. Recipientes de ensaio

Recipientes em vidro, com uma capacidade aproximada de um litro (adequadamente cobertos com tampas de plástico, discos ou filme de plástico perfurados para efeitos de ventilação) cheios com uma dada quantidade de substrato húmido para ensaio ou substrato de controlo, equivalente a 500 g de substrato seco.

1.6.2. *Condições do ensaio*

Os recipientes devem ser mantidos em câmaras climatizadas a uma temperatura de 20 ± 2 °C com luz contínua. A intensidade da luz deve situar-se entre 400 e 800 luz.

A duração do ensaio é de 14 dias, mas pode-se optar por avaliar a mortalidade após terem decorrido 7 dias desde o início do ensaio.

1.6.3. *Método de ensaio*

Concentrações de ensaio

As concentrações da substância de ensaio são expressas em peso de substância por unidade de peso seco do substrato de base (mg/kg).

Ensaio de determinação de concentrações

O intervalo de concentrações susceptível de provocar mortalidades de zero a 100 % pode ser determinado num ensaio de determinação de concentrações, com o objectivo de fornecer informações relativas ao intervalo de concentrações a utilizar no ensaio definitivo.

A substância deve ser ensaiada nas seguintes concentrações: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg substância/kg de substrato de ensaio (peso seco).

Se se efectuar um ensaio definitivo completo, um meio de ensaio por cada concentração e um meio para o controlo não tratado, cada um dos quais com dez minhocas, pode ser suficiente para o ensaio de determinação de concentrações.

Ensaio definitivo

Os resultados do ensaio de determinação de concentrações são utilizados para escolher pelo menos cinco concentrações segundo uma série geométrica que provoquem uma mortalidade de 0 a 100 %, diferindo entre si de um factor constante não superior a 1,8.

Um ensaio que utilize estas séries de concentração deve permitir avaliar com a maior precisão possível o valor de CL_{50} e os respectivos limites de confiança.

No ensaio definitivo utilizam-se pelo menos quatro meios de ensaio por concentração e quatro meios de controlo sem tratamento, cada um deles com dez minhocas. Os resultados das repetições destes meios são expressos em termos de média e desvio padrão.

Quando duas concentrações consecutivas, com uma razão de 1,8 entre si, dão apenas mortalidades de 0 % e 100 %, esses dois valores são suficientes para determinar o intervalo em que se situa a CL_{50}.

Mistura do substrato de base para o ensaio e da substância de ensaio

Sempre que possível, o substrato para o ensaio deve ser preparado sem quaisquer aditivos além de água. Prepara-se uma emulsão ou dispersão da substância de ensaio em água desionizada ou outro solvente e, imediatamente antes do início do ensaio, mistura-se com o substrato de base para o ensaio, ou pulveriza-se uniformemente sobre ele, com um dispositivo de pulverização para cromatografia fina ou outro semelhante.

Se a substância de ensaio for insolúvel em água, pode ser dissolvida num determinado volume, o mais pequeno possível, de um solvente orgânico adequado (por exemplo: hexano, acetona ou clorofórmio).

Para solubilizar, dispersar ou emulsionar a substância de ensaio apenas se podem utilizar agentes que se volatilizem facilmente. O substrato para o ensaio deve ser arejado antes de ser utilizado. A quantidade de água evaporada deve ser substituída. O controlo deve conter o mesma quantidade de qualquer aditivo.

Se a substância de ensaio não for solúvel, dispersível ou emulsionável, em solventes orgânicos, misturam-se 490 g de substrato de ensaio seco com 10 g de uma mistura de areia fina com quartzo e uma quantidade de substância de ensaio correspondente à dose necessária para tratar 500 g de solo artificial seco.

Para cada meio de ensaio, são colocados, em cada recipiente de vidro, uma dada quantidade de substrato húmido para o ensaio, equivalente a 500 g de peso seco e, sobre a superfície do substrato para o ensaio, 10 minhocas. Estas minhocas foram acondicionadas durante 24 horas num substrato de base húmido semelhante ao de ensaio, após o que foram rapidamente lavadas e a água em excesso absorvida com um papel de filtro antes da utilização.

Os recipientes são cobertos com tampas de plástico, discos ou filmes de plástico perfurados para evitar que o substrato seque e são mantidos nas condições de ensaio durante 14 dias.

A avaliação deve ser efectuada 14 dias (e facultativamente sete dias) após o início do ensaio. O substrato é espalhado sobre uma placa de vidro ou aço inoxidável. Examinam-se então as minhocas e determina-se o número de sobreviventes. Considera-se que as minhocas estão mortas se não reagirem a um ligeiro estímulo mecânico aplicado na extremidade frontal.

Quando o exame é efectuado no 7º dia, o recipiente enche-se novamente com substrato e as minhocas sobreviventes são de novo colocadas na mesma superfície do substrato de ensaio.

1.6.4. *Organismos a utilizar no ensaio*

Os organismos a utilizar no ensaio devem ser adultos da espécie *Eisenia foetida* (ver nota em anexo) (pelo menos com 2 meses de vida e com clitelo), com peso húmido de 300 a 600 mg (ver método de reprodução em anexo).

2. DADOS

2.1. Processamento e avaliação de resultados

As concentrações da substância de ensaio apresentam-se em função das percentagens correspondentes de minhocas mortas.

Quando os dados são adequados, o valor CL_{50} e os limites de confiança ($p = 0,05$) devem ser determinados utilizando métodos padrão (*Litchfield e Wilcoxon*, 1949, ou método equivalente). O valor CL_{50} deve ser expresso em mg de substância de ensaio por kg de substrato de ensaio (peso seco).

Nos casos em que o declive da curva de concentrações é demasiado abrupto para permitir o cálculo da CL_{50}, é suficiente uma estimativa gráfica deste valor.

Quando duas concentrações consecutivas com uma razão de 1,8 entre si provocam 0 % e 100 % de mortalidade, estes dois valores são suficientes para indicar o intervalo entre o qual se situa a CL_{50}.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do ensaio

O relatório do ensaio deve incluir, se possível, as seguintes informações:

— referir se o ensaio foi efectuado de acordo com os critérios de qualidade acima mencionados,

— tipo de ensaio (ensaio de determinação de concentrações e/ou ensaio definitivo),

— descrição exacta das condições de ensaio ou referir se o ensaio foi efectuado de acordo com o método; devem ser referidos todos os desvios em relação ao método indicado,

— descrição exacta do modo como a substância de ensaio foi misturada com o substrato de base para o ensaio,

— informações relativas aos organismos utilizados no ensaio (espécie, idade, peso médio e intervalo de variação do peso, condições de reprodução e manutenção, fornecedor),

— método utilizado na determinação da CL_{50},

— resultados dos ensaios, incluindo todos os dados utilizados,

— descrição dos sintomas ou alterações do comportamento observados nos organismos utilizados no ensaio,

— mortalidade nos controlos,

— CL_{50} ou a mais elevada concentração ensaiada que não provocou mortalidade e a concentração ensaiada mais baixa que provocou uma mortalidade de 100 %, catorze dias (e facultativamente sete dias) após o início do ensaio,

— representação gráfica da curva concentração-resposta,

— resultados obtidos com a substância de referência quer em relação ao presente ensaio quer provenientes de anteriores ensaios de controlo de qualidade.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OCDE, Paris, 1981, *Test Guideline 207,* Decisão C (81) 30 final do Conselho.

(2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R. *Biology of Earthworms*, Chapman and Hall, London, 331 pp.

(3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Ecologie et Systematique,* Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.*, vol. 96, 1949, p. 99.

(5) Comissão das Comunidades Europeias, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicology of chemical substances to earthworms*, Report EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden», in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie*, ecomed. Landsberg, 1986.

Apêndice

Reprodução e manutenção das minhocas antes do ensaio

Para reproduzir os animais, colocar 30 a 50 minhocas adultas numa caixa de reprodução com substrato fresco e removê-las ao fim de 14 dias. Estes animais podem ser utilizados para futuros lotes de reprodução. As posturas são utilizadas no ensaio quando atingirem a maturidade (nos termos das condições determinadas, ao fim de 2 a 3 meses).

Condições de reprodução e manutenção

Câmara climatizada: temperatura 20 ± 2 °C, de preferência dispondo de luz contínua (de intensidade 400 a 800 lux).

Caixas de reprodução: recipientes adequados de pequena profundidade, com um volume de 10 a 20 l.

Substrato: *Eisenia foetida* pode ser criada em vários excrementos animais. Recomenda-se como meio de reprodução a utilização de uma mistura de 50 % de turfa e 50 % de estrume de cavalo ou vaca. O meio deve ter um pH de aproximadamente 6 a 7 (ajustado com carbonato de cálcio) e baixa condutividade iónica (inferior a 6 mmhos ou 0,5 % de concentração de sais).

O substrato deve ser húmido, mas não demasiado molhado.

Além do método acima referido, podem ser utilizados com êxito outros processos.

Nota: Eisenia foetida existe sob a forma de duas subespécies que alguns taxonomistas separaram em espécies (Bouche, 1972). São morfologicamente semelhantes mas uma delas, a *Eisenia foetida foetida,* apresenta como característica listas ou bandas transversais sobre os segmentos e a outra, a *Eisenia foetida andrei,* não possui tal característica, apresentando uma coloração avermelhada matizada. Sempre que possível, deve-se utilizar a *Eisenia foetida andrei.* Podem ser utilizadas outras espécies desde que se disponha da necessária metodologia.

BIODEGRADAÇÃO

ENSAIO DE ZAHN E WELLENS

1. MÉTODO

1.1. Introdução

O objectivo do presente método é a avaliação da biodegradação final potencial de substâncias orgânicas, não voláteis, solúveis em água quando são expostas a concentrações relativamente elevadas de microrganismos num ensaio estático.

Pode-se verificar adsorção físico-química sobre os sólidos em suspensão, o que deve ser tomado em consideração na interpretação dos resultados (ver 3.2).

As substâncias a estudar são utilizadas em concentrações que correspondem a valores de COD que vão de 50 a 400 mg/litro ou a valores de CQO situados entre 100 e 1 000 mg/l (COD = carbono orgânico dissolvido; CQO = carência química de oxigénio). Estas concentrações relativamente elevadas asseguram uma boa confiança analítica. Os compostos dotados de propriedades tóxicas podem atrasar ou inibir o processo de degradação.

No presente método, utiliza-se a medição da concentração do carbono orgânico dissolvido ou a carência química de oxigénio para avaliar a biodegradação final da substância de ensaio.

A utilização simultânea de um método analítico específico pode permitir a avaliação da biodegradação primária da substância (desaparecimento da estrutura química inicial).

O método apenas se aplica às substâncias orgânicas que, na concentração utilizada no ensaio:

— são solúveis em água nas condições do ensaio,

— têm uma pressão de vapor negligenciável nas condições do ensaio,

— não exercem efeitos inibidores sobre as bactérias,

— não sofrem uma adsorção importante pelo equipamento de ensaio,

— não desaparecem da solução de ensaio devido à formação de espuma.

Na interpretação dos resultados obtidos, especialmente nos casos em que estes resultados são baixos ou marginais, é útil conhecer as proporções relativas dos principais elementos constituintes da substância de ensaio.

Na interpretação de resultados pouco elevados e na selecção das concentrações de ensaio adequadas, é desejável dispor de informações relativas à toxicidade da substância em relação aos microrganismos.

1.2. Definições e unidades

A taxa de degradação alcançada no final do ensaio constitui a 'Biodegradação no ensaio de Zahn e Wellens':

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

em que:

D_T = biodegradação (%) no instante T,

C_A = Valores do COD (ou da CQO) da mistura de ensaio medidos três horas após o início do ensaio (mg/l) (COD = carbono orgânico dissolvido, CQO = carência química do oxigénio),

C_T = valores do COD ou da CQO na mistura do ensaio no momento da colheita da amostra (mg/l),

C_B = valor do COD ou da CQO do ensaio em branco no momento da colheita da amostra,

C_{BA} = valor do COD ou da CQO do ensaio em branco, medido três horas após o início do ensaio (mg/l).

A taxa de degradação obtida é arredondada até ao valor inteiro da percentagem mais próxima.

A percentagem de degradação é definida como sendo a percentagem de remoção de COD (ou da CQO) da substância de ensaio.

A diferença entre o valor medido após 3 horas e o valor inicial calculado ou de preferência, medido, pode fornecer informações úteis relativas à eliminação da substância (ver 3.2, Interpretação dos resultados).

1.3. **Substâncias de referência**

No estudo de novas substâncias, podem por vezes ser úteis substâncias de referência; contudo, ainda não podem ser recomendadas substâncias de referência específicas.

1.4. **Princípio do método de ensaio**

Colocam-se num recipiente de vidro de 1 a 4 litros de capacidade, munido de um agitador e de um arejador, uma solução aquosa de lamas activadas, substâncias nutritivas minerais e a substância de ensaio que constituem a única fonte de carbono. A mistura é agitada e arejada a uma temperatura de 20 a 25 °C, sob uma iluminação difusa ou numa câmara escura durante um período que pode ir até vinte e oito dias. Acompanha-se o processo de degradação determinando o valor do COD (ou da CQO) na solução filtrada, diariamente ou segundo uma outra periodicidade adequada. Após cada período, o COD (ou a CQO) eliminado é referido ao valor verificado três horas após o início do ensaio e expresso em percentagem de biodegradação; isto constitui a medida da taxa de degradação nesse momento. O resultado é representado graficamente em função do tempo, o que permite obter a curva de biodegradação.

Se se utiliza um método analítico específico, podem-se medir as variações da concentração da molécula original atribuíveis à biodegradação (biodegradação primária).

1.5. **Critérios de qualidade**

A reprodutibilidade do presente método foi provada num ensaio de intercalibração.

A sensibilidade do método é largamente determinada pela variabilidade do ensaio em branco e, em menor extensão, pela precisão da determinação do carbono orgânico dissolvido e da concentração da substância de ensaio no meio.

1.6. **Descrição do método de ensaio**

1.6.1. *Preparações*

1.6.1.1. Reagentes

Água utilizada no ensaio: água de beber contendo menos de 5 mg/l de carbono orgânico. A concentração total de iões, cálcio e magnésio não deve ultrapassar 2,7 mmoles/l; se não for o caso, corrigir a diluição com a necessária quantidade de água desionizada ou destilada.

Ácido sulfúrico de pureza analítica (P.A.):	50 g/l.
Solução de hidróxido de sódio P.A.:	40 g/l.
Solução nutritiva mineral: dissolver num litro de água desionizada:	
cloreto de amónio, NH_4Cl, P.A.:	38,50 g,
dihidrogenofosfato de sódio, $NaH_2PO_4.2H_2O$, P.A.:	33,40 g,
dihidrogenofosfato de potássio KH_2PO_4, P.A.:	8,50 g,
monohidrogenofosfato de dipotássio K_2HPO_4, P.A.:	21,75 g.

A mistura serve simultaneamente de meio nutritivo e solução tampão.

1.6.1.2. Equipamento

Recipientes de vidro com uma capacidade de 1 a 4 litros (por exemplo, recipientes cilíndricos).

Dispositivos de agitação com um agitador em vidro ou em metal fixado a uma haste adequada (o agitador deve descrever um movimento rotativo a cerca de 5 a 10 cm do fundo do recipiente). Pode-se utilizar igualmente um agitador magnético com 7 a 10 cm de comprimento.

Tubo de arejamento em vidro com 2 a 4 mm do diâmetro interno. A abertura do tubo deve situar-se cerca de 1 cm acima do fundo do recipiente.

Centrífuga (cerca de 3 550 g).

Potenciómetro.

Aparelho para a medição do oxigénio dissolvido.

Papéis de filtro.

Aparelho de filtração por membrana.

Membranas filtrantes de porosidade 0,45 µm. As membranas filtrantes são adequadas se não libertarem carbono e não absorverem a substância na fase da filtração.

Material de análise para a dosagem do carbono orgânico e a determinação da carência química de oxigénio.

1.6.1.3. Preparação do inóculo

Lavar as lamas activadas provenientes de uma estação de tratamento biológica por sucessivas centrifugações ou decantações com água do ensaio (ver acima).

As lamas activadas devem possuir as características adequadas. Esta lama pode ser obtida numa estação de tratamento de águas residuais em boas condições de funcionamento. Para dispor do maior número possível de diferentes espécies ou de estirpes de bactérias, pode ser preferível misturar os inóculos provenientes de diferentes fontes (por exemplo, de diferentes estações de tratamento, extractos de solo, água de rios, etc.). A mistura deve ser tratada tal como é acima indicado.

Para o controlo da actividade das lamas activadas, ver abaixo «Controlo funcional».

1.6.1.4. Preparação das soluções de ensaio

Num recipiente de ensaio, adicionar 500 ml de água de ensaio, 2,5 ml/l de solução mineral nutritiva e uma quantidade de lamas activadas correspondente a 0,2 a 1,0 g/l de matéria seca na mistura final. Adicionar uma quantidade suficiente de solução de reserva da substância de ensaio de modo a obter, na mistura final, uma concentração de COD de 50 a 400 mg/l. Os valores correspondentes de CQO são 100 a 1 000 mg/l. Adicionar água até um volume total de 1 a 4 litros. O volume total escolhido depende do número de amostras a colher para a determinação do COD ou da CQO e do volume necessário para a análise.

Normalmente consideram-se dois litros como o volume satisfatório. Para cada série de ensaios, preparar pelo menos um recipiente controlo (branco) contendo apenas as lamas activadas e a solução mineral nutritiva, diluídas com água de ensaio, até se dispor de um volume total idêntico ao dos recipientes de ensaio.

1.6.2. *Execução do ensaio*

Agitam-se os recipientes de ensaio com agitadores magnéticos ou agitadores a hélice, sob iluminação difusa ou numa câmara escura, a uma temperatura de 20 a 25 °C. O arejamento processa-se por injecção de ar comprimido purificado por um filtro de algodão em rama e, se necessário, por um frasco de lavagem. Deve-se garantir que a lama não se deposite e que a concentração de oxigénio não desça abaixo de 2 mg/l.

O valor de pH deve ser verificado a intervalos regulares (por exemplo, diariamente) e ajustado a pH 7 a 8, se necessário.

As perdas devidas à evaporação são compensadas, imediatamente antes de cada colheita de amostras, com água desionizada ou destilada nas quantidades adequadas. Um bom método consiste em marcar o nível do líquido no recipiente antes de dar início ao ensaio. Após cada colheita, marcam-se de novo os recipientes (sem arejamento nem agitação). As primeiras amostras são sempre colhidas três horas após o início do ensaio, de modo a permitir detectar uma adsorção da substância de ensaio pelas lamas activadas.

À degradação da substância de ensaio segue-se a dosagem do COD ou da CQO, diariamente, ou a outro intervalo regular. Filtrar as amostras provenientes do recipiente de ensaio e do recipiente de controlo (branco) através de um papel de filtro cuidadosamente lavado. Rejeitar os primeiros 5 ml do filtrado da solução de ensaio. As lamas dificilmente filtráveis podem ser previamente eliminadas por uma centrifugação de 10 minutos. As determinações do COD e da CQO efectuam-se pelo menos em duplicado. A duração dos ensaios prolonga-se até 28 dias.

Observação: As amostras que permanecem turvas são filtradas através de filtros de membrana. Estes não devem libertar nem adsorver matérias orgânicas.

Controlo funcional de lamas activadas

Por cada série de ensaios é necessário prever um recipiente que contenha uma substância conhecida de forma a poder verificar a capacidade funcional de lamas activadas. O dietilenoglicol revelou-se útil para este efeito.

Adaptação

Se as análises são efectuadas a intervalos relativamente curtos (por exemplo diariamente), a curva de degradação pode fazer salientar claramente um fenómeno de adaptação (ver figura 2). O ensaio não deverá, portanto, ser iniciado imediatamente antes de um fim-de-semana.

Se a adaptação tem lugar nos últimos dias do ensaio, este deve ser prolongado até à degradação completa.

Observação: Se for necessário um melhor conhecimento do comportamento da lama, as mesmas lamas activadas são expostas de novo à mesma substância de ensaio de acordo com o seguinte processo:

Parar o agitador e o arejador e deixar precipitar as lamas activadas. Retirar o sobrenadante, encher com água de ensaio até perfazer dois litros, agitar durante 15 minutos e deixar de novo precipitar. Retirar de novo o sobrenadante e utilizar as restantes lamas para repetir o ensaio com a mesma substância, em conformidade com os pontos 1.6.1.4 e 1.6.2 anteriores. As lamas activadas podem igualmente ser separadas por centrifugação em vez de precipitação.

As lamas adaptadas podem ser misturadas com as lamas frescas para atingir 0,2 a 1 g de matéria seca/litro.

Análises

De um modo geral as amostras são filtradas através de um papel de filtro cuidadosamente lavado com água desionizada.

As amostras que permanecem turvas são filtradas através de filtros de membrana (0,45 μm).

Determinar a concentração de COD em duplicado nos filtrados das amostras (rejeitar os primeiros 5 ml) com o auxílio de um aparelho de medição do TOC. Se a análise do filtrado não puder ser efectuada no próprio dia, conservá-la no frigorífico até ao dia seguinte. Não é aconselhável conservá-la mais tempo.

Determinar a concentração da CQO nos filtrados das amostras com o auxílio do dispositivo de análise da CQO, em conformidade com o procedimento descrito no ponto 2 seguinte.

2. RESULTADOS E AVALIAÇÃO

Proceder a, pelo menos, duas determinações da concentração do COD e da CQO nas amostras, em conformidade com as indicações acima fornecidas em 1.6.2. Calcular a percentagem de degradação no instante T de acordo com a fórmula (com as suas definições) dada no ponto 1.2 anteriormente indicado.

Arredondar a taxa de degradação até à unidade de percentagem mais próxima. A taxa de degradação atingida no final do ensaio constitui a «Biodegradação no ensaio de Zahn-Wellens».

Observação: Se se realiza a degradação completa antes do final da duração do ensaio e se este resultado for confirmado por uma segunda análise efectuada no dia seguinte, pode-se dar o ensaio por concluído.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do ensaio

O relatório do ensaio, deve incluir, se possível, as seguintes informações:

— a concentração inicial da substância,

— quaisquer outras indicações e os resultados experimentais relativos à substância ensaiada, à substância de referência eventualmente usada e ao ensaio de controlo (branco),

— a concentração após três horas,

— a curva de biodegradação com a respectiva descrição,

— a data e o local de colheita dos organismos de ensaio, fase de adaptação, concentração utilizada, etc,

— as razões científicas de eventuais alterações ao método de ensaio.

3.2. Interpretação dos resultados

A eliminação do COD (ou da CQO) que se produz gradualmente durante um determinado número de dias ou de semanas indica que a substância ensaiada se degrada biologicamente.

Contudo, uma adsorção físico-química pode desempenhar um papel em determinados casos, o que é indicado quando se verifica uma remoção total ou parcial da substância desde o início, durante as primeiras três horas, e a diferença entre os licores sobrenadantes de ensaio e de controlo permanecem a um nível inesperadamente baixo.

São necessários ensaios suplementares se se pretender estabelecer a distinção entre biodegradação (ou biodegradação parcial) e adsorção.

Existem diversos métodos para estabelecer tal distinção, sendo o melhor a utilização do sobrenadante como inóculo num ensaio preliminar (de preferência um ensaio respirométrico).

As substâncias de ensaio que conduzem a uma elevada remoção neste ensaio, não associada à adsorção do COD (ou do CQO), devem ser consideradas como potencialmente biodegradáveis. Uma eliminação parcial, não associada à adsorção, indica que o produto químico é, pelo menos, biodegradável em determinada extensão. Uma eliminação baixa ou nula de COD (ou de CQO) pode ser atribuída à inibição dos microrganismos pela substância ensaiada, o que pode ser também revelado pela lise e perda de lamas, dando origem a sobrenadantes turvos. O ensaio deve ser repetido utilizando uma menor concentração da substância de ensaio.

A utilização de um método analítico específico em relação a um composto ou de uma substância de ensaio marcada com ^{14}C pode permitir uma maior sensibilidade. No caso dos compostos marcados com ^{14}C, a recuperação do $^{14}CO_2$ confirmará que se verificou biodegradação.

Quando os resultados se exprimem em termos de biodegradação primária, deve ser dada, se possível, uma explicação relativa à modificação de estrutura química que conduz a uma diminuição da resposta da substância original.

A validade do método analítico deve ser acompanhada da indicação da resposta encontrada no ensaio de controlo (branco).

4. REFERÊNCIAS

(1) OCDE, Paris, 1981, *Test Guideline 302 B,* Decisão C(81) 30 final do Conselho.

(2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Directiva 84/449/CEE da Comissão, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* nº L 251 de 19. 9. 1984.

Apêndice

EXEMPLO DE UMA AVALIAÇÃO

Composto orgânico: ácido 4-etoxibenzóico
Concentração teórica no ensaio: 600 mg/l
COD teórico: 390 mg/l

Inóculo: estação de tratamento de águas residuais de . . .
Concentração: 1 grama matéria seca/litro
Estado de adaptação: não adaptado

Análise: determinação do COD

Volume da amostra: 3 ml

Substância de controlo: dietilenoglicol

Toxicidade do composto: sem efeitos tóxicos para valores inferiores a 1 000 mg/l
Ensaio realizado: ensaio em tubos de fermentação

Instante do ensaio	Substância de controlo				Substância de ensaio		
	Branco COD (1) mg/l	COD (1) mg/l	COD líquido mg/l	Degradação %	COD (1) mg/l	COD líquido mg/l	Degradação %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 horas	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dia	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dias	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dias	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dias	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dias	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dias	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dias	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dias	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Valores médios de três determinações.

Figura 1

Exemplos de curvas de biodegradação

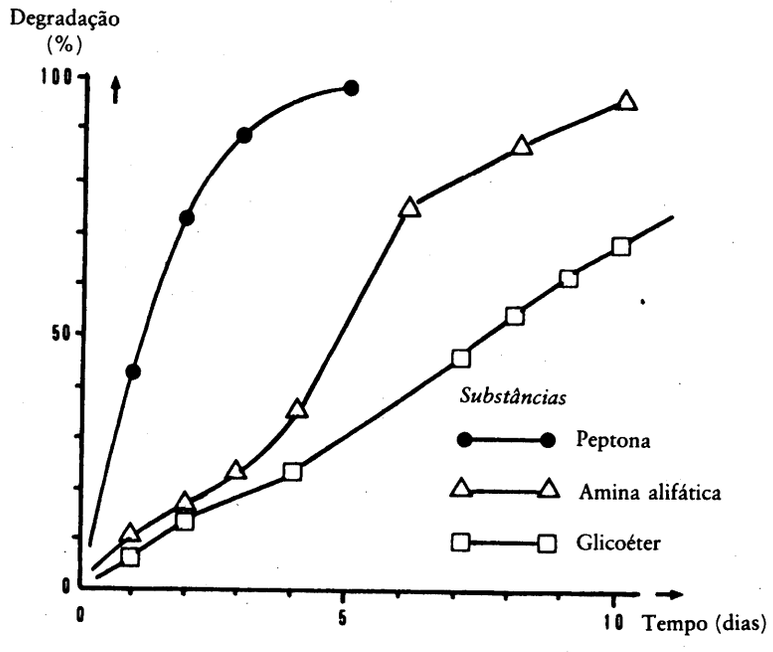
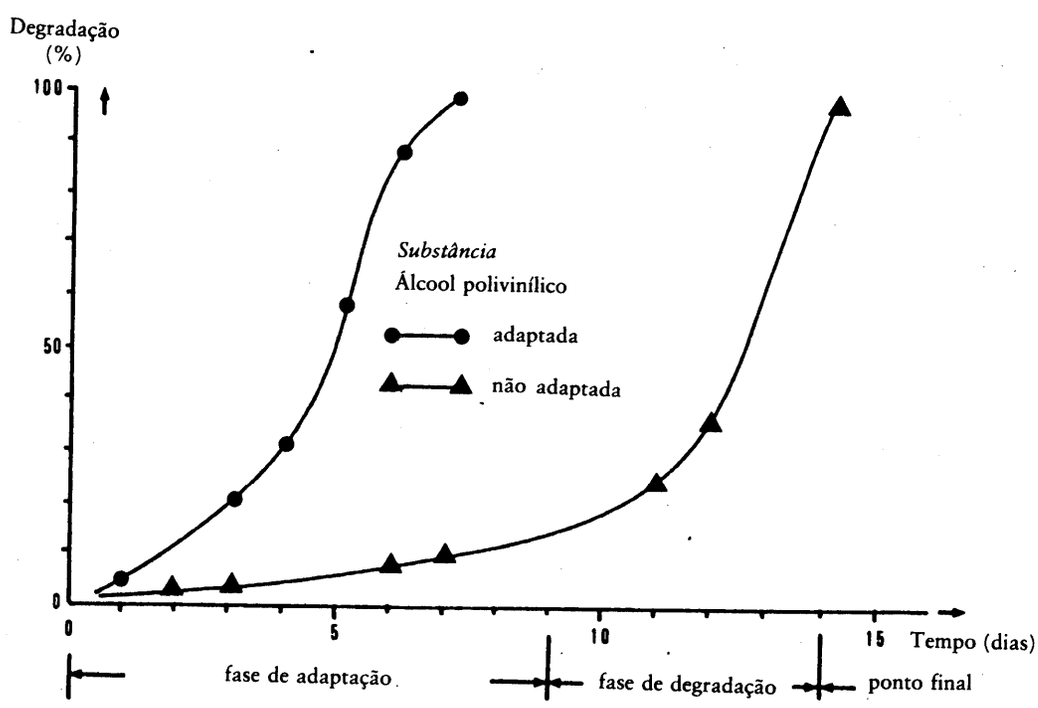


Figura 2

Exemplos de adaptação das lamas



BIODEGRADAÇÃO

ENSAIOS DE SIMULAÇÃO DE LAMAS ACTIVADAS

1. MÉTODO

1.1. Introdução

1.1.1. *Observações gerais*

Este método aplica-se apenas às substâncias orgânicas que nas concentrações utilizadas no teste:

— são suficientemente solúveis em água para permitir a preparação das soluções de ensaio,

— têm uma pressão de vapor negligenciável nas condições do ensaio,

— não provocam um efeito inibidor sobre as bactérias.

Na interpretação dos resultados obtidos, especialmente nos casos em que os resultados são pouco elevados ou marginais, serão úteis as informações respeitantes às proporções relativas dos principais componentes da substância de ensaio.

Para a interpretação dos resultados pouco elevados e na selecção das adequadas concentrações de ensaio, são desejáveis informações relativas à toxicidade da substância para os microrganismos.

1.1.2. *Determinação da biodegradação final (análises COD/CQO)*

O objectivo do presente método é determinar a biodegradação final medindo a remoção da substância e quaisquer metabolitos num modelo de uma estação de lamas activadas a uma concentração correspondente a mais de 12 mg COD/l (ou aproximadamente 40 mg de CQO/l). Parece ser 20 mg COD/l o valor óptimo. (COD = carbono orgânico dissolvido; CQO = carência química de oxigénio).

Deve ser determinado o teor em carbono orgânico (ou a carência química de oxigénio) de uma substância a ensaiar.

1.1.3. *Determinação da biodegradação primária (análise específica*

O objectivo do método é determinar o biodegradação primária de uma substância num modelo de uma estação de lamas activadas, a uma concentração de cerca de 20 mg/l, utilizando um método analítico específico (podem utilizar-se concentrações maiores ou menores se o método analítico e as características de toxicidade o permitirem), o que torna possível a avaliação da biodegradação primária de uma substância (desaparecimento da estrutura química inicial).

O objectivo do presente método *não* é a determinação da mineralização da substância de ensaio.

Deve ser possível dispor de um método analítico adequado para a determinação da substância de ensaio.

1.2. Definições e unidades

1.2.1. *Análise COD/CQO*

A taxa de remoção de uma substância é dada pela fórmula:

$$TR = \frac{T - (E - E_O)}{T} \times 100\% \qquad [1\ (a)]$$

em que:

TR = taxa de remoção em percentagem de COD (ou de CQO) ao longo de um dado tempo de retenção médio da substância de ensaio,

T = concentração da substância de ensaio no afluente, em mg de COD/l (ou mg de CQO/l),

E = concentração de COD (ou CQO) no efluente da unidade de ensaio, em mg de COD/l (ou em mg de CQO/l),

E_O = concentração de COD (ou CQO) no efluente da unidade em branco, em mg COD/l (ou CQO/l).

A degradação é expressa em termos de percentagem de remoção de COD (ou de CQO) no decurso de um dado tempo de retenção da substância de ensaio.

1.2.2. *Análise específica*

A percentagem de eliminação da substância de ensaio da fase aquosa (R_W) durante um dado tempo de retenção médio é dada pela fórmula:

$$R_W = \frac{C_I - C_O}{C_I} \times 100\% \qquad [1\ (b)]$$

em que:

C_I = concentração da substância no afluente da unidade de ensaio (mg de substância/l, determinada por análise específica),

C_O = concentração da substância no efluente da unidade de ensaio (mg de substância/l, determinada por análise específica).

1.3. **Substâncias de referência**

Quando se estuda uma nova substância, podem, por vezes, revelar-se úteis substâncias de referência; contudo, ainda não podem ser recomendadas substâncias de referência especiais.

1.4. **Princípios dos métodos de ensaio**

Para a determinação da biodegradação final utilizam-se em paralelo duas unidades-piloto de lamas activadas (ensaio de confirmação OCDE ou unidades de vasos porosos). A substância de ensaio é adicionada ao afluente (águas residuais sintéticas ou domésticas) de uma das unidades, enquanto a outra recebe apenas as águas residuais. Para a determinação da biodegradação primária, com uma análise específica do afluente e do efluente, apenas se utiliza uma unidade.

As concentrações de COD (ou de CQO) são medidas nos efluentes, ou recorre-se a análises específicas para determinação das concentrações da substância.

O COD atribuível à substância de ensaio não é determinado, mas simplesmente referido.

Quando se efectuam medições do COD (ou de CQO), considera-se que a diferença entre as concentrações médias do efluente do ensaio e do efluente do controlo é devida à substância de ensaio não degradada.

Quando se efectuam análises específicas, podem ser medidas variações de concentração da molécula mãe (biodegradação primária).

As unidades podem funcionar segundo o «método das unidades interligadas», através de um processo de transinoculação.

1.5. **Critérios de qualidade**

A concentração inicial da substância depende do tipo de análise efectuada e respectivas limitações.

1.6. **Descrição do método de ensaio**

1.6.1. *Preparação*

1.6.1.1. Equipamento

É necessário um par de unidades do mesmo tipo, excepto quando são efectuadas análises específicas. Podem ser utilizados dois tipos de equipamento:

Ensaio de confirmação da OCDE

O equipamento (Apêndice 1) consiste num recipiente de armazenagem (A) para as águas residuais sintéticas, uma bomba de doseamento (B), um recipiente de arejamento (C), um decantador (D), uma bomba de ar comprimido (E) para reciclar as lamas activadas e um recipiente (F) para a recolha do efluente tratado.

Os recipientes (A) e (F) devem ser de vidro ou de uma matéria plástica adequada e com uma capacidade de pelo menos 24 litros. A bomba (B) deve fornecer ao recipiente de arejamento um fluxo constante de águas residuais sintéticas; pode ser utilizado qualquer sistema adequado, desde que se assegure o fluxo de entrada e a concentração.

Durante o funcionamento normal, a altura do decantador (D) é fixada de modo a que o volume contido no recipiente de arejamento seja de 3 litros de licor misto. É suspenso no recipiente (C), por cima do cone, um arejador poroso (G). A quantidade de ar insuflada através do arejador deve ser registada por meio de um medidor de fluxo.

A bomba de ar comprimido (E) é fixada de modo a que as lamas activadas provenientes do decantador sejam contínua e regularmente recicladas para o recipiente de arejamento (C).

«Vaso poroso»

O vaso poroso é constituído por folhas de polietileno poroso (2 mm de espesura, diâmetro máximo dos poros 95 µm), enroladas de forma a constituir um cilindro de 14 cm de diâmetro, com uma base cónica de 45° (Figuras 1 e 2 do Apêndice 2). O vaso poroso é colocado dentro de um recipiente estanque em matéria plástica adequada com 15 cm de diâmetro e com um orifício na parte cilíndrica a 17,2 cm da base do cilindro que determina a capacidade (3 l) do vaso. À volta do topo do vaso interior existe um anel de suporte rígido, em matéria plástica adequada de modo a que exista um espaço para o efluente de 0,5 cm entre os recipientes interior e exterior.

Os vasos porosos podem ser colocados na base de um banho de água controlado termostaticamente. Na base do vaso interior são colocados difusores adequados de modo a haver um fornecimento de ar na base.

Os recipientes (A) e (E) devem ser de vidro ou de matéria plástica adequada com uma capacidade de, pelo menos, 24 litros. A bomba (B) deve fornecer ao recipiente de arejamento um fluxo constante de águas residuais sintéticas; pode ser utilizado qualquer sistema adequado, desde que sejam assegurados o fluxo de entrada e a concentração.

São necessários vasos porosos interiores de reserva para substituir qualquer um que eventualmente seja obstruído durante a utilização; os vasos obstruídos podem ser limpos por imersão durante 24 horas numa solução de hipoclorito, seguida de uma lavagem cuidadosa com água da torneira.

1.6.1.2. Filtração

Aparelho de filtração de membrana e filtros de membrana, com uma porosidade de 0,45 µm. Os filtros de membrana são adequados se se garantir que não libertam carbono nem adsorvem a substância de ensaio na fase de filtração.

1.6.1.3. Águas residuais

Pode ser utilizado quer um efluente sintético adequado quer águas residuais domésticas.

Exemplo de um efluente sintético

Dissolver por cada litro de água da torneira:

Peptona:	160 mg,
Extracto de carne:	110 mg,
Ureia:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
$CaCl_2.2H_2O$:	4 mg,
$MgSO_4.7H_2O$:	2 mg,
K_2HPO_4:	28 mg.

Águas residuais domésticas

Devem ser diariamente colhidas do sobrenadante do tanque de decantação primária de uma estação de tratamento que trate predominantemente águas residuais domésticas.

1.6.1.4. Solução de reserva da substância de ensaio

Deve ser preparada uma solução da substância de ensaio, por exemplo a 1 %, para se adicionar a concentração da substância de modo a que se conheça o volume adequado a adicionar à água residual ou directamente à unidade, através de uma segunda bomba que forneça a concentração de ensaio necessária.

1.6.1.5. Inóculo

Observação: Quando se utilizam águas residuais domésticas, não se justifica a utilização de um inóculo com uma baixa concentração de bactérias, mas podem-se utilizar lamas activadas.

Pode-se utilizar uma grande variedade de inóculos.

Apresentam-se três exemplos de inóculos adequados:

a) Inóculo do efluente secundário

O inóculo deve ser recolhido de um efluente secundário de boa qualidade, proveniente de uma estação de tratamento que trate predominantemente águas residuais domésticas. O efluente deve ser mantido em condições aeróbias no período entre a colheita das amostras e a sua utilização. Para preparar o inóculo filtra-se a amostra através de um filtro grosseiro e rejeitam-se os primeiros 200 ml. Mantém-se o filtrado em condições aeróbias até ser utilizado. Deve-se utilizar o inóculo no próprio dia da sua colheita e na inoculação devem-se utilizar pelo menos 3 ml.

b) Inóculo composto

Inóculo de efluente secundário:

Ver a descrição anterior.

Inóculo do solo:

Faz-se a suspensão de 100 g de terra de jardim (fértil, não esterilizada) em 1 000 ml de água de beber isenta de cloro. (Não são adequados solos com uma fracção extremamente elevada de argila, areia ou húmus). Após agitar a suspensão, deixa-se sedimentar durante 30 minutos. Filtra-se o sobrenadante através de um papel de filtro grosseiro, rejeitando-se os primeiros 200 ml. Areja-se imediatamente o filtrado e mantém-se arejado até ao momento da sua utilização. Deve-se utilizar o inóculo no próprio dia da sua colheita.

Inóculo de uma água superficial:

Obtém-se um outro inóculo parcial a partir de uma água superficial mesossapróbica. Filtra-se a amostra através de um papel de filtro grosseiro, rejeitando os primeiros 200 ml. Mantém-s o filtrado em condições aeróbias até ao momento da sua utilização. Deve-se utilizar o inóculo no próprio dia da sua colheita.

Juntam-se volumes iguais das três amostras de inóculos parciais, misturam-se cuidadosamente e retira-se o inóculo final desta mistura. Deve-se utilizar na inoculação pelo menos 3 ml.

c) Inóculo de lamas activadas

Pode ser utilizado como inóculo um determinado volume (não superior a 3 litros) de lamas activadas (teor em sólidos suspensos até a 2,5 g/l) colhidos de um tanque de arejamento de uma estação que trate predominantemente águas residuais domésticas.

1.6.2. *Método*

O ensaio é efectuado à temperatura ambiente, que deve ser mantida entre 18 °C e 25 °C.

Se tal for conveniente, o ensaio pode ser efectuado a uma temperatura inferior (até 10 °C); se a substância se degradar, não será normalmente exigida qualquer outra operação. Se, contudo, a substância não for degradada, o ensaio deve ser prosseguido a uma temperatura constante entre 18 °C e 25 °C.

1.6.2.1. Período inicial: formação das lamas/estabilização das unidades

O período de crescimento/estabilização das lamas é o período durante o qual a concentração de sólidos suspensos nas lamas activadas e a eficiência das unidades evolui até uma fase estacionária nas condições de funcionamento utilizadas.

O período inicial é o período que se estende desde o momento em que a substância de ensaio é adicionada pela primeira vez até ao instante em que a sua remoção atinge uma fase estacionária (valor relativamente constante). Este período não deve ultrapassar seis semanas.

O período de avaliação é de três semanas, a contar do momento em que a remoção da substância de ensaio atinge um valor relativamente constante e, em geral, elevado. Para as substâncias que apresentam uma degradação baixa ou nula durante as primeiras seis semanas, o período de avaliação considera-se como sendo as três semanas seguintes.

Começar por encher a(s) unidade(s) necessária(s) a um ensaio com o inóculo misturado com o afluente.

Accionam-se então o arejador [e a bomba de ar comprimido (E) no caso do ensaio de confirmação da OCDE] e a bomba de doseamento (B).

O afluente, sem a substância a ensaiar, deve passar através do recipiente de arejamento (C) quer à velocidade de um litro por hora quer à velocidade de meio litro por hora, o que dá um tempo de retenção médio de três ou seis horas.

A taxa de arejamento deve ser regulada de modo a que o conteúdo do recipiente (C) se mantenha constantemente em suspensão enquanto o teor em oxigénio dissolvido seja pelo menos de 2 mg/l.

Deve-se evitar a formação de espuma mediante meios adequados. Não devem ser utilizados agentes para evitar a formação de espumas que inibam as lamas activadas.

As lamas que se depositarem em torno do topo do recipiente de arejamento (C), [e no ensaio de confirmação da OCDE, na base do recipiente de decantação (D) e no circuito de circulação] devem ser de novo misturadas com o licor misto pelo menos uma vez por dia mediante raspagem ou qualquer outro meio adequado.

Quando as lamas já não conseguirem depositar-se, a sua densidade pode ser aumentada adicionando fracções de 2 ml de uma solução de cloreto de ferro a 5 %, quantas vezes for necessário.

O efluente é recolhido no recipiente (E ou F) durante vinte a vinte e quatro horas e colhe-se uma amostra depois de o misturar cuidadosamente. Deve-se proceder a uma cuidadosa limpeza do recipiente (E ou F).

Para vigiar e controlar a eficiência do processo mede-se a carência química de oxigénio (CQO) ou o carbono orgânico dissolvido (COD) do filtrado do efluente acumulado pelo menos duas vezes por semana e igualmente do afluente filtrado [utilizando uma membrana de porosidade igual a 0,45 µm, são rejeitados (aproximadamente) os primeiros 20 ml do filtrado].

A redução de CQO e COD deve estabilizar-se quando se atingir uma degradação diária regular.

O teor das lamas activadas em matéria seca no recipiente de arejamento deve ser determinado duas vezes por semana (em g/l). Pode-se fazer funcionar as unidades de uma das duas seguintes maneiras: determinar duas vezes por semana quer o teor em matéria seca das lamas activadas e no caso de ser superior a 2,5 g/l retirar as lamas activadas em excesso quer retirar diariamente 500 ml de licor misto de cada recipiente de modo a obter um tempo de retenção médio das lamas de seis dias.

Quando os parâmetros estimados e medidos [eficiência do processo (em termos de remoção de CQO e COD), concentração das lamas, decantabilidade das lamas, turvação dos efluentes, etc,] das duas unidades são suficientemente estáveis, a substância de ensaio pode ser adicionada ao afluente de uma das unidades, seguindo o ponto 1.6.2.2.

A substância de ensaio pode ser adicionada, alternativamente, no início do período de crescimento das lamas (1.6.2.1), em especial quando as lamas são introduzidas como inóculo.

1.6.2.2. Método de ensaio

Mantêm-se as condições de funcionamento do período inicial e adiciona-se ao afluente da unidade de ensaio uma quantidade suficiente de solução-mãe (aproximadamente 1 %) da substância de ensaio de modo a que se obtenha a concentração desejável da substância de ensaio (aproximadamente 10 a 20 mg COD/l ou 40 mg CQO/l) nas águas residuais, o que pode ser feito misturando diariamente a solução-mãe nas águas residuais ou mediante um sistema de bombagem separado. Esta concentração pode ser atingida progressivamente. Se não se verificarem efeitos tóxicos da substância de ensaio sobre as lamas activadas podem experimentar-se concentrações mais elevadas.

A unidade em branco é alimentada apenas com afluente isento de substâncias adicionadas. Colhem-se volumes adequados de efluentes para análise e filtram-se através de filtros de membrana (045 µm), rejeitando os primeiros 20 ml (aproximadamente) de filtrado.

As amostras filtradas devem ser analisadas no próprio dia ou então devem ser conservadas mediante qualquer método adequado, por exemplo, utilizando 0,05 ml de uma solução de cloreto mercúrico ($HgCl_2$) a 1 % por cada 10 ml de filtrado ou armazenando o filtrado entre 2 a 4 °C até um máximo de 24 horas ou abaixo de – 18 °C para períodos de tempo mais longos.

O período ao longo do qual se estende a experiência, que inclui a adição da substância de ensaio, não deve ultrapassar seis semanas e o período de avaliação não deve ser inferior a três semanas, ou seja, deve-se poder dispor de cerca de 14 a 20 determinações para o cálculo do resultado final.

Interligação das unidades

A interligação das unidades obtém-se trocando entre si, uma vez por dia, 1,5 l de licor misto (incluindo lamas) proveniente dos recipientes de arejamento das lamas activadas de duas unidades. No caso das substâncias de ensaio serem fortemente adsorventes, retiram-se apenas 1,5 l do líquido sobrenadante dos recipientes de decantação e deitam-se para o recipiente com lamas activadas da outra unidade.

1.6.2.3. Análise

Para acompanhar o comportamento da substância, podem ser efectuados dois tipos de análise:

COD ou CQO

As concentrações de COD são determinadas em duplicado com o analisador de carbono e/ou os valores da CQO são determinados em conformidade com a referência (2).

Análise específica

As concentrações da substância de ensaio são determinadas mediante um método analítico adequado. Sempre que possível, deve efectuar-se uma determinação específica da substância adsorvida nas lamas.

2. RESULTADOS E AVALIAÇÃO

2.1. Interligação das unidades

Quando se utiliza a interligação das unidades calculam-se as taxas de remoção TR diárias em % de acordo com 1.2.1.

Estas taxas de remoção TR diárias são corrigidas em termos de TRc para o material transferido devido ao processo de transinoculação através da equação [2] para um tempo de retenção médio de três horas ou da equação [3] para um tempo de retenção médio de 6 horas.

$$TRc = \frac{8}{7} TR - \frac{100}{7} \qquad [2]$$

$$TRc = \frac{4}{3} TR - \frac{100}{3} \qquad [3]$$

Calcula-se a média das séries dos valores TRc e ainda o desvio padrão de acordo com a equação 4:

$$S_{TRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{TRc} - TRc_i)^2}{n - 1}} \qquad [4]$$

em que:

S_{TRc} = desvio padrão das séries de valores TRc

$\overline{TRc}$ = média do valor TRc

n = número de determinações

Rejeitam-se os valores discrepantes das séries TRc segundo um processo estatistíco adequado, por exemplo, o de Nalimov [6] para um nível de probabilidade de 95 % e calcula-se de novo a média e o desvio padrão do conjunto de dados TRc sem os valores discrepantes.

Calcula-se então o resultado final recorrendo à equação [5]:

$$TRc = \overline{TRc} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{TRc} \qquad [5]$$

em que:

$t_{n-1;\alpha}$ = valor tabelado de t para n pares de valores de E e E_O e confiança estatística P (P = 1 – α) pelo que P é fixado a 95 % (1).

O resultado é expresso pela média com limites de tolerância ao nível de probabilidade de 95 %, o desvio padrão e o número de dados da série das TRc menos os valores discrepantes, e o número de valores discrepantes, por exemplo:

TRc = 98,6 ± 2,3 % da remoção de COD,

s = 4,65 % da remoção de COD,

n = 18,

x = número de valores discrepantes.

2.2. **Unidades não interligadas**

O rendimento das unidades pode ser verificado do seguinte modo:

$$\% \text{ de remoção de CQO ou COD} = \frac{\text{CQO ou COD das águas residuais — CQO ou COD do efluente}}{\text{CQO ou COD das águas residuais}} \times 100$$

Esta remoção diária pode ser representada graficamente para permitir identificar qualquer tipo de tendência, por exemplo, climatização.

2.2.1. **Utilização da determinação da CQO/COD**

A taxa diária de remoção em % TR calcula-se segundo 1.2.1.

Calcula-se a média da série de valores TR e ainda o seu desvio padrão segundo a fórmula seguinte:

$$S_{TR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{TR} - TR_i)^2}{n - 1}} \qquad [6]$$

em que:

S_{TR} = desvio padrão da série de valores TR_i

$\overline{TR}$ = média dos valores TR_i

n = número de determinações.

Eliminam-se os valores discrepantes da série TR de acordo com um método estatístico adequado, por exemplo, o de Nalimov [6], ao nível de probabilidade de 95 % e calcula-se de novo o desvio padrão da série de dados TR, menos os valores discrepantes.

O resultado final é calculado por meio de equação [7]:

$$TR = \overline{TR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{TR} \qquad [7]$$

em que:

$t_{n-1;\alpha}$ = valor tabelado de t para n pares de valores de E e E_O e confiança estatística P (P = 1 – α) em que P é fixado a 95 % (1).

O resultado é expresso como a média com limites de tolerância ao nível de probabilidade de 95 %, o respectivo desvio padrão e o número de dados da série dos TR menos os valores discrepantes, e o número de valores discrepantes, por exemplo:

TR = (98,6 ± 2,3 %) de remoção de COD,

s = 4,65 % de remoção de COD,

n = 18,

x = número de valores discrepantes.

2.2.2. *Utilização de análise específica*

Calcula-se a percentagem de eliminação da substância a ensaiar da fase aquosa (R_W) de acordo com 1.2.2.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do ensaio

O relatório do ensaio, deve incluir, se possível, as seguintes informações:

— o formulário incluído no Anexo III, indicando as condições de funcionamento do ensaio,

— o equipamento escolhido (ensaio de confirmação da OCDE ou ensaio de vaso poroso),

— o modo de funcionamento escolhido: unidades interligadas ou não,

— as águas residuais: sintéticas ou domésticas,

— No caso das águas residuais domésticas: data e local de colheita da amostra,

— o inóculo com data e local de colheita da amostra,

— uma descrição do método de análise, se forem efectuadas análises específicas,

— a representação gráfica da remoção CQO ou COD em função do tempo durante o período inicial e o período de avaliação,

— recuperação analítica da substância de ensaio na forma de CQO ou COD na solução mãe,

— se foram efectuadas análises específicas, a representação gráfica da percentagem de remoção da substância a ensaiar da fase aquosa em função do tempo (período inicial e período da avaliação),

— a remoção média de COD ou de CQO da substância a ensaiar e o desvio padrão é calculado a partir dos resultados do período de avaliação, ou seja, quando há uma remoção regular da substância a ensaiar ou se verifica um período de funcionamento estacionário,

— a representação gráfica da concentração das lamas activadas em função do tempo,

— qualquer observação relativa às lamas activadas (rejeição de um excesso de lama, presença de um aglomerado, $FeCl_3$, etc.),

— concentração da substância utilizada no ensaio,

— todos os resultados relativos à análise efectuada nas lamas,

— todas as informações e resultados experimentais relativos à substância ensaiada e, se fôr caso disso, à substância de referência,

— as razões científicas de quaisquer modificações da metodologia.

3.2. **Interpretação dos resultados**

Uma remoção baixa da substância ensaiada da fase aquosa pode ser devida a uma inibição dos microrganismos pela substância ensaiada, o que pode igualmente traduzir-se por uma lise e perda de lamas, dando origem a um sobrenadante turvo, e por uma diminuição da eficiência da instalação-piloto do ponto de vista da remoção do COD (ou CQO).

A adsorção físico-química pode por vezes, ter influência. As diferenças entre a acção biológica na molécula e a adsorção fisico-química podem ser reveladas por uma análise efectuada nas lamas após uma desorção adequada.

São necessários ensaios complementares, se se pretender estabelecer uma distinção entre biodegradação (ou biodegradação parcial) e adsorção, o que pode ser feito de diferentes maneiras, mas a mais conveniente consiste em utilizar o sobrenadante como inóculo num ensaio preliminar (de preferência ensaio respirométrico).

Se se observarem remoções acentuadas de COD ou CQO, estas são devidas a biodegradação enquanto que para as remoções baixas não é possível distinguir entre biodegradação e eliminação. Por exemplo, se um composto solúvel apresenta uma constante de adsorção elevada de 98 % e se a taxa diária de rejeição de lamas excedentárias é de 10 %, é possível uma eliminação que atinja 40 % no máximo; para uma taxa de rejeição de lamas excedentárias de 30 %, a eliminação devida à adsorção e à rejeição de lamas excedentárias pode atingir 65 % (4).

No caso de uma análise específica, é conveniente ter em atenção a relação entre a estrutura da substância e a análise específica efectuada. Nesse caso, o fenómeno observado não pode ser interpretado como uma mineralização da substância.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OCDE, Paris, 1981, *Test Guideline 303 A,* Decisão C(81) 30 final do Conselho.

(2) Annex V C9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Directiva 84/449/CEE da Comissão, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* nº L 251 de 19. 9. 1984.

(3) Painter H. A., King E. F., *WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability,* Technical Report TR70, Junho 1978, Water Research Center, United Kingdom.

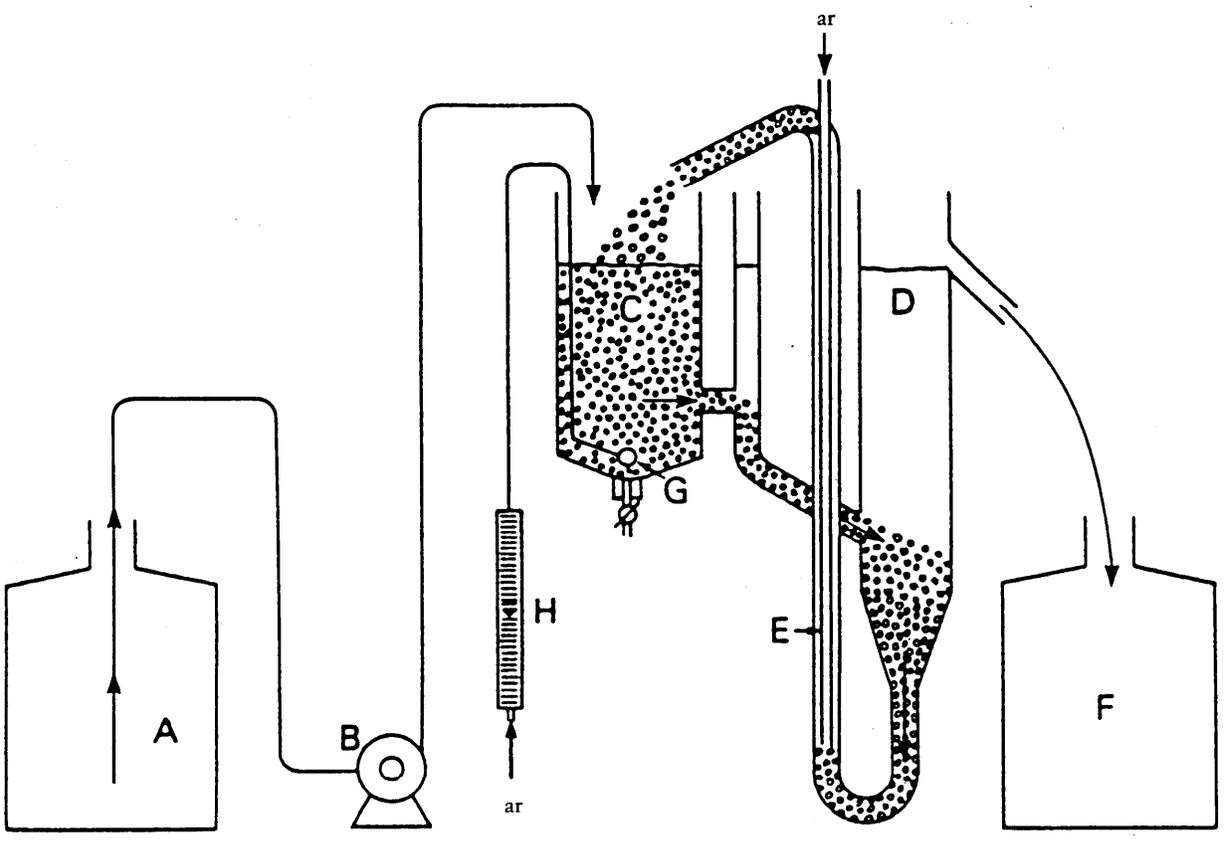
(4) Wierich, P., Gerike, P., The Fate of Soluble. Recalcitrant, and Adsorbing Compounds in Activated Sludge Plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety,* vol. 5, nº 2, Junho 1981, pp. 161 a 171.

(5) Directivas 82/242/CEE e 82/243/CEE do Conselho, JO nº L 109 de 22. 4. 1982 que altera as Directivas 73/404/CEE e 73/405/CEE do Conselho: Biodegradabilidade dos detergentes, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* nº L 347 de 17. 12. 1973.

(6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fesenius-Zeitschrift für Analytische Chemie* 303(1980), pp. 406 a 408.

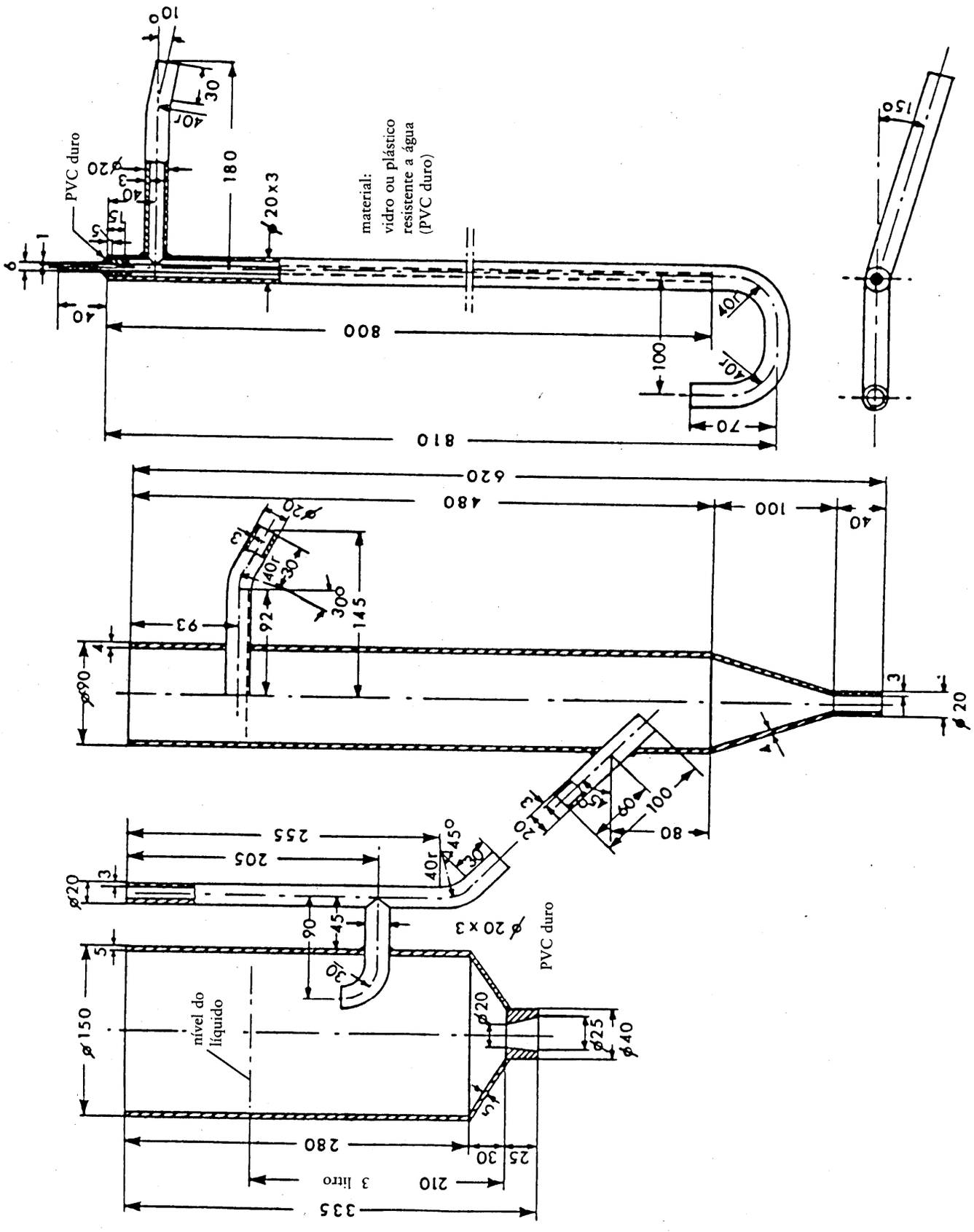
Apêndice 1

Figura 1



A = recipiente de armazenagem;
B = bomba de doseamento;
C = recipiente de arejamento (capacidade 3 l);
D = decantador;
E = bomba de ar comprimido;
F = recipiente colector;
G = arejador;
H = medidor de caudal de ar (facultativo).

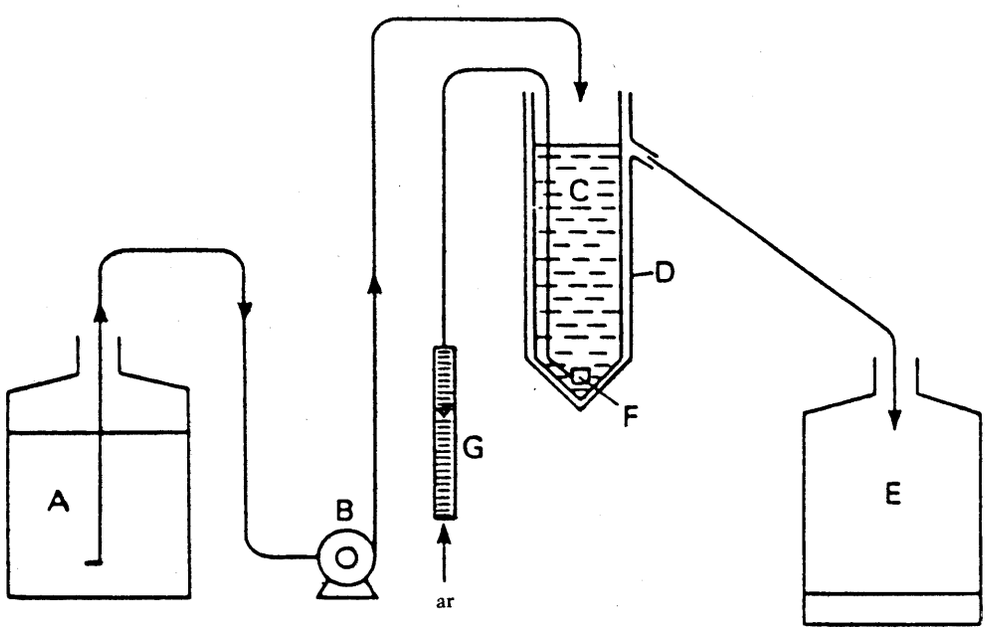
Figura 2


PVC duro
material:
vidro ou plástico
resistente a água
(PVC duro)
nível do
líquido
3 litro

Apêndice 2

Figura 1

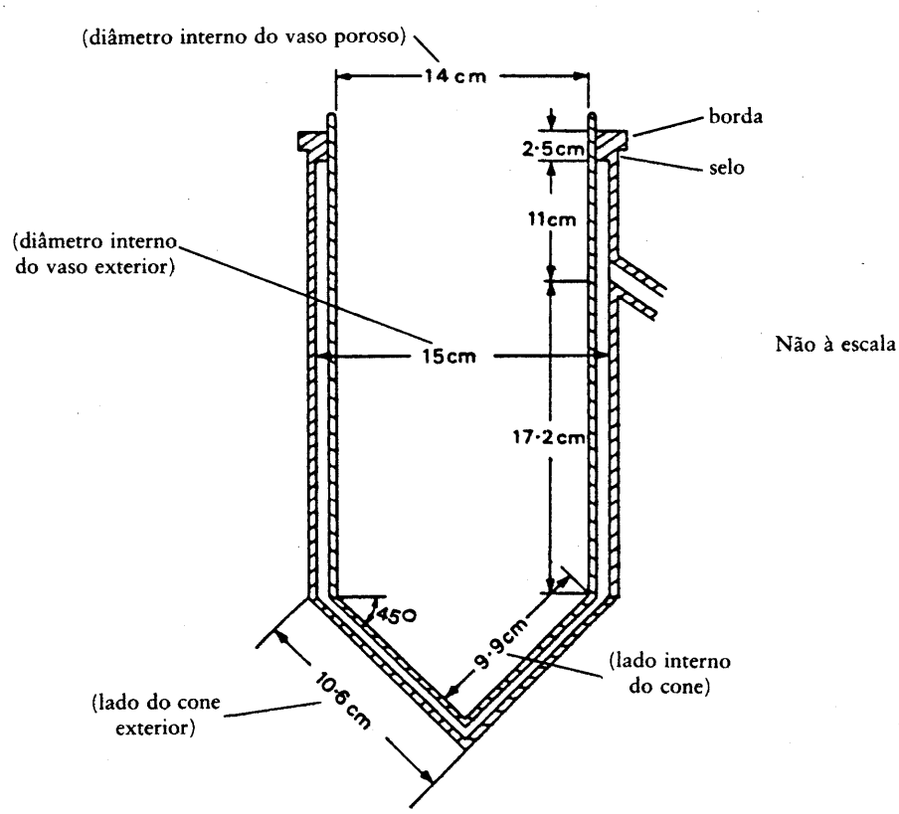
Equipamento utilizado na avaliação da biodegradação



A = recipiente de armazenagem;
B = bomba de doseamento;
C = recipiente de arejamento poroso;
D = recipiente estanque;
E = colector do efluente;
F = arejador por difusão;
G = medidor de rotações (facultativo).

Figura 2

Pormenor do vaso poroso de arejamento de três litros



Apêndice 3

Condições de funcionamento do ensaio de simulação das lamas activadas

Verificar em cada grupo

Equipamento

Confirmação OCDE
Vaso poroso

Modo de funcionamento

Unidade simples
Unidades interligadas
Unidades não interligadas

Transinoculação

Inexistente
Lamas activadas
Sobrenadante

Tempo médio de retenção

três horas
seis horas

Elemento nutritivo de base

Águas residuais domésticas
Águas residuais sintéticas

Inóculo

Efluente secundário
Compósito
Lamas activadas

Adição da substância a ensaiar

Desde o início
Aumento progressivo
Após formação das lamas

Análise

Específica
CQO
COD

BIODEGRADAÇÃO

LAMAS ACTIVADAS: ENSAIO DE INIBIÇÃO DA RESPIRAÇÃO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

O método descrito avalia o efeito da substância de ensaio sobre os microrganismos medindo a taxa respiratória em condições determinadas, na presença de diferentes concentrações da substância de ensaio.

O objectivo do presente método é fornecer um processo de selecção rápido que permita identificar as substâncias de ensaio que podem afectar negativamente o funcionamento das estações de tratamento microbiano aeróbio e indicar as concentrações adequadas não inibidoras das substâncias de ensaio a utilizar nas experiências de biodegradação.

Um ensaio (preliminar) pode preceder o ensaio final, o qual fornecerá informações relativas à gama de concentrações a utilizar no ensaio principal.

Além dos ensaios com a substância a estudar, incluem-se no protocolo experimental dois controlos, um no início e outro no final da série de experiências. Cada lote de lamas activadas deve igualmente ser testado utilizando uma substância de referência.

O presente método aplica-se sobretudo a substâncias que, em virtude da sua solubilidade na água e fraca volatilidade são susceptíveis de permanecer na água. Para as substâncias cuja solubilidade no meio do ensaio é limitada, pode não ser possível determinar a CE_{50}.

Os resultados baseados no consumo de oxigénio podem conduzir a conclusões erróneas quando a substância de ensaio tem tendência a romper a fosforilação oxidativa.

Para efectuar o ensaio, é útil dispôr das seguintes informações:

— solubilidade na água,

— pressão de vapor,

— fórmula de estrutura,

— pureza da substância de ensaio.

Recomendação:

As lamas activadas podem conter organismos potencialmente patogénicos e devem ser manipuladas com prudência.

1.2. Definições e unidades

A taxa respiratória é o consumo de oxigénio dos microorganismos aeróbios contidos nas lamas das águas residuais, expresso geralmente em mg O_2 por mg de lamas por hora.

Para calcular o efeito inibidor de uma substância de ensaio numa dada concentração; exprime-se a taxa respiratória sob a forma de percentagem da média:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{percentagem de inibição}$$

em que:

R_s = taxa de consumo de oxigénio da substância de ensaio a uma dada concentração,

Rc_1 = taxa de consumo de oxigénio do controlo 1,

Rc_2 = taxa de consumo de oxigenio do controlo 2.

Neste método, a CE_{50} é a concentração da substância de ensaio para a qual a taxa respiratória é 50 % da verificada no controlo, nas condições descritas neste método.

1.3. **Substâncias de referência**

Recomenda-se a utilização como substância de referência do 3,5-diclorofenol, um conhecido inibidor da respiração e para cada lote de lamas activadas, determina-se a CE_{50} dessa substância a fim de avaliar se a sensibilidade das lamas não é anormal.

1.4. **Princípio do método de ensaio**

Mede-se a taxa respiratória das lamas activadas alimentadas com uma quantidade padrão de águas residuais sintéticas após um tempo de contacto de 30 minutos ou de três horas, ou de ambos. Por outro lado, mede-se igualmente a taxa respiratória das mesmas lamas activadas em presença de diversas concentrações da substância de ensaio em condições idênticas. O efeito inibidor da substância de ensaio a uma determinada concentração é expresso como uma percentagem do valor médio das taxas respiratórias dos dois controlos. Calcula-se um valor de CE_{50} a partir das determinações feitas a diferentes concentrações.

1.5. **Critérios de qualidade**

Os resultados do ensaio são válidos se:

— as taxas respiratórias dos dois controlos não diferirem entre si mais de 15 %,

— a CE_{50} (30 minutos e/ou três horas) do 3,5-diclorofenol se situa num intervalo aceitável de 5 a 30 mg/l.

1.6. **Descrição do método de ensaio**

1.6.1. *Reagentes*

1.6.1.1. Soluções da substância de ensaio

Preparam-se soluções frescas da substância de ensaio no início deste a partir de uma solução-mãe. É adequada uma solução-mãe com a concentração de 0,5 g/l quando se utiliza a metodologia a seguir indicada.

1.6.1.2. Solução da substância de controlo

Pode-se preparar, por exemplo, uma solução de 3,5-diclorofenol dissolvendo 0,5 g de 3,5 — diclorofenol em 10 ml de 1M NaOH, diluindo depois em água destilada até perfazer aproximadamente 30 ml e adicionando, ao mesmo tempo que se agita, 0,5 M H_2SO_4 até ao início da precipitação — são necessários aproximadamente 8 ml de 0,5 M H_2SO_4 — e por fim, dilui-se a mistura com água destilada até perfazer 1 litro. O pH deverá então estar compreendido entre 7 e 8.

1.6.1.3. Águas residuais sintéticas

Prepara-se uma alimentação de águas resíduais sintéticas dissolvendo as seguintes quantidades de substâncias num litro de água:

— 16 g de peptona,

— 11 g de extracto de carne,

— 3 g de ureia,

— 0,7 g de NaCl,

— 0,4 g de $CaCl_2.2H_2O$,

— 0,2 g de $MgSO_4.7H_2O$,

— 2,8 g de K_2HPO_4.

Nota 1: Esta água residual sintética é 100 vezes mais concentrada do que a descrita no relatório técnico da OCDE «Método proposto para a determinação da biodegradação dos agentes tensio-activos utilizados nos detergentes sintéticos», de 11 de Junho de 1976 com a adição de, hidrogenofosfato de dipotássio.

Nota 2: Se o meio que se preparou não for utilizado imediatamente, deve ser guardado em condições de obscuridade, à temperatura de 0 a 4 °C, por um período máximo de uma semana, em condições em que não se verifique qualquer alteração da sua composição.

Antes de se proceder ao seu armazenamento, o meio pode igualmente ser esterilizado ou proceder-se à adição da peptona e do extracto de carne um pouco antes de efectuar o ensaio. Antes de utilizar este meio, deve-se misturar completamente e ajustar-se o pH.

1.6.2. *Equipamento*

Aparelho de medição: não é essencial uma concepção específica do aparélho. Contudo, não deve existir qualquer espaço vazio por cima do líquido e o eléctrodo deve adaptar-se perfeitamente ao gargalo do frasco de medição.

É necessário um equipamento normal de laboratório e, especialmente os seguintes instrumentos:

— aparelho de medição,

— dispositivo de arejamento,

— eléctrodo e aparelho de medição do pH,

— eléctrodo de oxigénio.

1.6.3. *Preparação do inóculo*

Como inóculo microbiano para o ensaio, utilizam-se lamas activadas provenientes de uma estação de tratamento de águas resíduais que trate predominantemente águas residuais domésticas.

Se necessário, no laboratório, as partículas grosseiras podem ser removidas por sedimentação durante um curto período de tempo, por exemplo de 15 minutos, e decantando posteriormente o sobrenadante, contendo os sólidos mais finos, para ser utilizado no ensaio. Alternativamente, podem-se misturar as lamas durante alguns segundos recorrendo a um misturador.

Além disso, se se suspeitar que se encontram presentes substâncias inibidoras, as lamas devem ser lavadas com água da torneira ou com uma solução isotónica. Após centrifugação, o sobrenadante é decantado (repete-se este processo três vezes).

Pesa-se e seca-se uma pequena quantidade de lamas. A partir deste resultado, pode-se calcular a quantidade de lamas húmidas que devem ser dispersas em água de modo a obter lamas activadas com uma concentração de sólidos suspensos no licor misto entre 2 e 4 g/l. Este valor conduz a uma concentração no meio de 0,8 a 1,6 g/l se se seguir a metodologia abaixo recomendada.

Se as lamas não puderem ser utilizadas no próprio dia da sua colheita, adicionam-se 50 ml de águas residuais sintéticas a cada litro de lamas activadas preparadas da forma acima descrita e arejam-se durante a noite à temperatura de 20 ± 2°C. Conservam-se arejadas para serem utilizadas durante o dia. Antes da sua utilização, verifica-se o pH e, se necessário, ajusta-se a pH 6,0 a 8,0: Os sólidos suspensos no licor misto devem ser determinados tal como foi descrito no parágrafo anterior.

Se for necessário utilizar o mesmo lote de lamas durante vários dias consecutivos (quatro dias no máximo) adiciona-se uma outra dose de 50 ml de água residual sintética por litro de lamas no final de cada dia de trabalho.

1.6.4. *Execução do ensaio*

Duração/tempo de contacto	30 minutos e/ou três horas, durante as quais o meio de ensaio é arejado
Água	água de beber (desclorada, se necessário)
Fornecimento de ar	ar limpo, sem óleo. Caudal de ar de 0,5 a 1 l/minuto
Aparelho de medição	frasco de fundo plano tal como o destinado à medição da DBO
Medidor de oxigénio	eléctrodo de oxigénio adequado com um registador.
Solução nutritiva	águas residuais sintéticas (ver acima)
Substância de ensaio	a solução de ensaio fresca é preparada no início do ensaio
Substância de referência	por exemplo, 3,5 diclorofenol (em pelo menos três concentrações)
Controlos:	amostra inoculada, sem substância de ensaio.
Temperatura:	20 ± 2 °C.

Sugere-se seguidamente um método experimental que pode ser aplicado tanto à substância de ensaio como à substância de referência para um tempo de contacto de três horas.

Utilizam-se vários recipientes (por exemplo, provetas de um litro).

Devem-se utilizar pelo menos cinco concentrações, espaçadas entre si por um factor constante que, de preferência, não deve ultrapassar 3,2.

No instante «O», a 16 ml de água residual sintética adiciona-se água até prefazer 300 ml. Juntam-se 200 ml de inóculo microbiano e deita-se a mistura (500 ml) para um primeiro recipiente (primeiro controlo C_1).

Os recipientes de ensaio devem ser continuamente arejados de modo a garantir que o O_2 dissolvido não desça abaixo de 2,5 mg/l e que imediatamente antes da medição da taxa respiratória, a concentração de O_2 seja de cerca de 6,5 mg/l.

Ao fim de 15 minutos (15 minutos é um intervalo arbitrário, mas conveniente), repete-se o procedimento anterior com a excepção de que se adicionam 100 ml da solução de reserva da substância de ensaio a 16 ml de água residual sintética, antes de proceder à adição de água até perfazer 300 ml e do inóculo microbiano até aos 500 ml. Esta mistura é em seguida deitada para um segundo recipiente e arejada tal como anteriormente. Repete-se este procedimento de quinze em quinze minutos com diferentes volumes da solução-mãe da substância de ensaio a fim de obter uma série de recipientes com diferentes concentrações da substância de ensaio. Por fim, prepara-se um segundo controlo (C_2).

Ao fim de três horas regista-se o pH, deita-se uma amostra bem misturada do conteúdo do primeiro recipiente no aparelho de medição e mede-se a taxa respiratória durante um período máximo de 10 minutos.

Repete-se esta determinação com o conteúdo de cada recipiente a intervalos de quinze minutos de modo a que o tempo de contacto em cada recipiente seja de três horas.

A substância de referência é ensaiada de modo idêntico com cada lote de inóculo microbiano.

Será necessário um processo diferente (por exemplo, mais do que um aparelho de medição de oxigénio) quando se efectuarem as medições após 30 minutos de contacto.

Se for necessário determinar o consumo de oxigénio, preparam-se recipientes suplementares contendo a substância de ensaio, água residual sintética e água, mas sem lamas activadas.

O consumo de oxigénio é medido e registado após um tempo de arejamento de 30 minutos e/ou três horas (tempo de contacto).

2. RESULTADOS E AVALIAÇÃO

A taxa respiratória calcula-se a partir do traçado do registador para as medições compreendidas aproximadamente entre 6,5 mg de O_2/l e 2,5 mg de O_2/l ou durante um período de dez minutos quando a taxa respiratória é baixa. A parte da curva respiratória sobre a qual se mede a taxa respiratória deve ser linear.

Se as taxas respiratórias dos dois controlos diferirem entre si de mais de 15 % ou se a CE_{50} (30 minutos e/ou três h) da substância de referência não se encontrar no intervalo aceitável (5 a 30 mg/l para o 3,5 — diclorofenol), o ensaio não é válido e deve ser repetido.

Calcula-se a percentagem de inibição para cada concentração de ensaio (ver 1.2). Representa-se graficamente em papel log-normal (ou log-probabilidade), a percentagem de inibição em função da concentração e deduz-se o valor de CE_{50}.

Podem ser determinados os intervalos de confiança a 95 % para os valores de CE_{50} segundo os métodos normalmente utilizados.

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do ensaio

O relatório do ensaio deve incluir, se possível, as seguintes informações:

— Substância de ensaio: dados de identificação química.

— Sistema de ensaio: origem, concentração e eventual tratamento prévio das lamas activadas.

— Condições de ensaio:
  — pH da mistura de reacção antes da medição da respiração,
  — temperatura de ensaio,
  — duração do ensaio,
  — substância de referência e respectiva CE_{50},
  — consumo abiótico de oxigénio (se se verificar).

— Resultados:
  — todos os dados determinados,
  — curva de inibição e método de cálculo da CE_{50},
  — CE_{50} e, se possível, intervalos de confiança a 95 %, CE_{20} e CE_{80},
  — todas as observações e quaisquer desvios em relação ao presente método de ensaio que poderiam ter influenciado os resultados.

3.2. Interpretação dos resultados

O valor da CE_{50} deve ser apenas considerado como uma indicação da toxicidade provável da substância de ensaio quer para o tratamento das águas residuais por lamas activadas quer para os microrganismos das águas residuais, uma vez que as complexas interacções que se verificam no ambiente não podem ser simuladas com precisão num ensaio de laboratório. Além disso, as substâncias de ensaio que podem ter um efeito inibidor na oxidação do amoníaco podem também produzir curvas de inibição atípicas. Por conseguinte, tais curvas devem ser cuidadosamente interpretadas.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) International Standard ISO 8192 — 1986

(2) Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, p. 165.

(3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, p. 245.

(4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries) *Recommended Method nº 103,* also described by:

(5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, p. 80.

(6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, p. 247.

(7) OCDE, Paris, 1981, *Test Guideline 209,* Decisão C(81) 30 final do Conselho.

BIODEGRADAÇÃO

ENSAIO L.A.S.C. MODIFICADO

1. MÉTODO

1.1. Introdução

O objectivo de método é avaliar a biodegradação final potencial de substâncias orgânicas solúveis em água e não voláteis quando expostas a concentrações relativamente elevadas de microrganismos durante um longo período de tempo. Durante este período, a viabilidade dos microrganismos é mantida através da adição diária de uma alimentação de águas resíduais decantadas. (Para conservação das águas residuais durante o fim de semana as mesmas poderão ser guardadas a 4 °C. Podem-se utilizar alternativamente as águas resíduais sintéticas do ensaio de confirmação da OCDE.)

Pode verificar-se uma adsorção físico-química aos sólidos suspensos, o que deve ser tomado em consideração na interpretação dos resultados (ver 3.2).

Devido ao extenso período de retenção da fase líquida (36 horas) e à adição intermitente de nutrientes, o ensaio não simula as condições que ocorrem numa estação de tratamento de águas residuais. Os resultados obtidos com várias substâncias de ensaio indicam que o ensaio apresenta um elevado potencial de biodegradação.

As condições do ensaio são altamente favoráveis à selecção e/ou adaptação de microrganismos capazes de degradar o composto ensaiado. (O procedimento pode igualmente ser utilizado na produção de inóculos adaptados para utilização em outros ensaios).

No presente método, utiliza-se a medida da concentração de carbono orgânico dissolvido na avaliação da biodegradação final das substâncias de ensaio. É preferível determinar o COD após acidificação e purificação do que através da diferença de $C_{total} - C_{inorgânico}$.

A utilização simultânea de um método analítico específico pode permitir a avaliação da degradação primária da substância (desaparecimento da estrutura química original).

O método apenas se aplica às substâncias orgânicas de ensaio que, nas concentrações utilizadas no ensaio:

— são solúveis em água (pelo menos 20 mg de carbono orgânico dissolvido/l),

— possuem uma pressão de vapor negligível,

— não adsorvem significativamente no sistema de ensaio,

— não se perdem na solução de ensaio devido a formação de espuma,

— não exercem efeitos inibidores sobre as bactérias.

Deve ser determinado o teor em carbono orgânico da substância de ensaio.

As informações respeitantes às proporções relativas dos componentes principais das substâncias de ensaio serão úteis na interpretação dos resultados obtidos, especialmente nos casos em que os resultados são baixos ou marginais.

As informações relativas à toxicidade da substância para os microrganismos pode ser útil na interpretação dos resultados baixos e na selecção das concentrações de ensaio adequadas.

1.2. Definições e unidades

C_E = concentração do composto ensaiado em carbono orgânico presente ou adicionado às águas residuais decantadas no início do período de arejamento (mg/l),

C_e = concentração do carbono orgânico dissolvido presente no licor sobrenadante do ensaio no final do período de arejamento (mg/l),

C_c = concentração do carbono orgânico dissolvido presente no licor sobranadante do controlo no final do período de arejamento (mg/l).

No presente método a biodegradação é definida como o desaparecimento de carbono orgânico. A biodegradação pode ser expressa em:

1. Remoção em percentagem D_{ad} da quantidade de substância adicionada diariamente:

$$D_{ad} = \frac{C_E - (C_e - C_c)}{C_E} \times 100 \qquad [1]$$

em que D_{ad} = degradação/adição diária.

2. A remoção em percentagem D_{sid} da quantitade de substância presente no início de cada dia:

$$D_{sid} = \frac{2C_E + C_{ei} - C_{ci} - 3C_{e(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_E + C_{ei} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\,(a)]$$

$$= \frac{2C_E - 2C\,(C_e - C_c)}{2C_E + (C_e - C_c)} \times 100 \qquad [2\,(b)]$$

D_{sid} = degradação/substância no início do dia;

em que os índices i e (i + 1) se referem ao dia da medição. A equação 2(a) é recomendada se o COD do efluente variar de um dia para outro, enquanto a equação 2(b) pode ser utilizada quando o COD do efluente permanece relativamente constante de um dia para o outro.

1.3. **Substâncias de referência**

Em alguns casos, quando se investiga uma nova substância, podem ser úteis substâncias de referência; contudo, não se recomenda aqui qualquer substância de referência específica.

Fornecem-se dados relativos a diversos compostos avaliados em ensaios de intercalibração (ver Apêndice I) de modo a que se possa fazer a calibração do método de tempos a tempos e a permitir a comparação dos resultados quando se utiliza outro método.

1.4. **Princípio do método de ensaio**

Numa unidade de lamas activadas semi-contínua (LASC), colocam-se lamas activadas provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais. Adicionam-se o composto a ensaiar e as águas resíduais domésticas decantadas e a mistura é arejada durante 23 horas. Pára-se depois o arejamento, permitindo a sedimentação das lamas e retira-se o licor sobrenadante.

As lamas que permanecem no tanque de arejamento são então misturadas com outra alíquota do composto de ensaio e águas residuais e repete-se o processo.

Avalia-se a biodegradação através da determinação do teor em carbono orgânico dissolvido no licor sobrenadante. Compara-se este valor com o que se obtêm para o licor proveniente de um tubo de controlo contendo apenas águas residuais decantadas.

Quando se utiliza um método analítico específico, podem medir-se alterações na concentração da molécula original devido a biodegradação (Biodegradação primária).

1.5. **Critérios de qualidade**

A reprodutibilidade do presente método baseado na remoção do carbono orgânico dissolvido ainda não foi estabelecida. (Quando se considera a biodegradação primária, obtêm-se dados muito precisos para substâncias que são consideravelmente degradadas).

A sensibilidade do método é determinada em larga medida pela variabilidade do ensaio em branco e em menor extensão, pela precisão da determinação do carbono orgânico dissolvido e teor do composto de ensaio no licor, no início de cada ciclo.

1.6. **Descrição do método de ensaio**

1.6.1. *Preparações*

Ligam-se um número suficiente de unidades de arejamento limpas (pode-se utilizar alternativamente a unidade de ensaio de 1,5 l de LASC inicial) e tubos para entrada do ar (figura 1) para cada substância de ensaio e controlo. O ar comprimido fornecido às unidades de ensaio, limpo através de um filtro de algodão, deve ser isento de carbono orgânico e pré-saturado com água de modo a reduzir as perdas por evaporação.

De uma estação de lamas activadas que trate predominantemente águas resíduais domésticas, retira-se uma amostra de licor misto contendo 1 a 4 g de sólidos suspensos/l. São necessários por cada unidade de arejamento cerca de 150 ml de licor misto.

Preparam-se soluções de reserva da substância de ensaio em água destilada; a concentração normalmente exigida é de 400 mg/l como carbono orgânico o que dá uma concentração no composto de ensaio de 20 mg/l de carbono no início de cada ciclo de arejamento se não se verificar biodegradação.

É possível utilizar concentrações mais elevadas se a toxicidade em relação aos microrganismos o permitir.

Mede-se o teor em carbono orgânico nas soluções de reserva.

1.6.2. *Condições de ensaio*

O ensaio deve efectuar-se a 20 a 25 °C.

Utiliza-se uma concentração elevada de microrganismos aeróbios (de 1 a 4 g/l de sólidos suspensos) e o período de retenção efectiva é de 36 horas. As substâncias carbonadas presentes nas águas residuais de alimentação, são largamente oxidadas, em geral no espaço de oito horas após o início de cada ciclo de arejamento. Em seguida, verifica-se uma respiração endógena das lamas durante o restante período de arejamento, no decurso do qual o único substracto disponível é o composto de ensaio a não ser que este seja também rapidamente metabolizado. Estas características associadas a uma reinoculação diária do ensaio quando são utilizadas como meio águas residuais domésticas fornecem condições altamente favoráveis tanto para a adaptação como para elevados graus de biodegradação.

1.6.3. *Execução do ensaio*

Retira-se uma amostra de licor misto de uma unidade laboratorial ou estação de lamas activadas predominantemente doméstica e conserva-se em condições aeróbias até ser utilizada no laboratório. Cada uma das unidades de arejamento e de controlo são cheios com 150 ml de licor misto (se se utilizar a unidade de ensaio LASC, multiplicar por 10 os volumes dados) e dá-se início ao arejamento. Após 23 horas, interrompe-se o arejamento e deixam-se sedimentar as lamas durante 45 minutos. Abrem-se sucessivamente as torneiras de cada um dos recipientes e rejeitam-se fracções de 100 ml do licor sobrenadante. Recolhe-se uma amostra de águas residuais domésticas decantadas imediatamente antes da utilização e adicionam-se 100 ml às lamas remanescentes em cada unidade de arejamento. Recomeça-se de novo o arejamento. Nesta fase, não se adicionam quaisquer substâncias de ensaio e as unidades são diariamente alimentadas com águas residuais domésticas apenas até ao momento em que se obtém na decantação um licor sobrenadante límpido. Este processo demora geralmente duas semanas, no fim das quais o carbono orgânico dissolvido no licor sobrenadante no final de cada ciclo de arejamento se aproxima de um valor constante.

No final deste período, misturam-se as lamas decantadas separadamente e adicionam-se a cada unidade 50 ml das lamas compostas resultantes.

Adicionam-se às unidades de controlo 95 ml de águas residuais decantadas mais 5 ml de água e ás unidades de ensaio 95 ml mais 5 ml da solução adequada de reserva do composto de ensaio (400 mg/l). Recomeça-se de novo o arejamento que prossegue durante 23 horas. Deixam-se então sedimentar as lamas durante 45 minutos e o sobrenadante é retirado e analisado o seu teor em carbono orgânico dissolvido.

Este processo de enchimento e esvaziamento é repetido diariamente ao longo do ensaio.

Antes da sedimentação pode ser necessário limpar as paredes das unidades de modo a evitar a acumulação de sólidos acima do nível do líquido. Para evitar uma contaminação cruzada, utilizam-se raspadores ou escovas individuais para cada unidade.

O ideal seria determinar diariamente o carbono orgânico dissolvidos nos licores sobrenadantes, embora sejam admissíveis análises menos frequentes. Antes da análise, os licores são filtrados através de filtros limpos de membrana de 0,45 mm ou centrifugados. Os filtros de membrana são adequados se se garantir que nem libertam carbono nem absorvem a substância durante o processo de filtração. A temperatura da amostra não deve exceder 40 °C quando se encontra na centrífuga.

A duração do ensaio para compostos que apresentam uma biodegradação fraca ou nula é indeterminada, mas a experiência sugere que deve ser, em geral, de pelo menos 12 semanas, mas nunca mais de 26 semanas.

2. RESULTADOS E AVALIAÇÃO

Representam-se graficamente, em função do tempo, os valores de carbono orgânico dissolvido nos licores sobrenadantes das unidades de ensaio e das unidades de controlo.

À medida que ocorre a biodegradação, o nível obtido no ensaio aproximar-se-á do obtido no controlo. Quando se verificar que a diferença entre os dois níveis é constante ao longo de três medições consecutivas, efectua-se o número de medições posteriores que seja necessário para permitir o tratamento estatístico dos dados e calcula-se a percentagem de biodegradação do composto de ensaio (D_{ad}, D_{sid}, ver 1.2).

3. RELATÓRIO

3.1. Relatório do ensaio

O relatório do ensaio, deve incluir, se possível, as seguintes informações:

— todas as informações relativas à natureza das águas residuais, tipo de unidade utilizada e resultados experimentais respeitantes à substância ensaiada, substância de referência se utilizada e ensaio em branco,

— a temperatura,

— a curva de remoção com a descrição e processo de cálculo (ver 1.2),

— data e local onde foram recolhidas as lamas activadas e as águas residuais, estado de adaptação, concentração, etc.,

— razões científicas de quaisquer alterações da metodologia,

— assinatura e data.

3.2. Interpretação dos resultados

Uma vez que a substância a ser ensaiada através do presente método não será imediatamente biodegradável, qualquer remoção do COD devido apenas à biodegradação será normalmente gradual ao longo de vários dias ou semanas, excepto nos casos em que a adaptação é repentina, tal como é indicado por uma remoção abrupta que ocorra após algumas semanas.

Todavia, a adsorção físico-química pode, por vezes, desempenhar um papel importante; isto verifica-se quando há uma remoção total ou parcial do COD adicionado no início. O que acontece posteriormente depende de factores tais como os graus de adsorção e a concentração dos sólidos em suspensão no efluente rejeitado. Em geral, a diferança entre a concentração de COD nos licores sobrenadantes do controlo e do ensaio aumenta gradualmente a partir de um valor inicial baixo e esta diferença mantém-se então ao nível do novo valor durante o resto da experiência, a menos que tenha lugar a adaptação.

Se for necessário estabelecer uma distinção entre biodegradação (ou biodegradação parcial) e adsorção, são necessários outros ensaios. Esta distinção pode ser obtida de diferentes modos mas o mais convincente é utilizar como inóculo o licor sobrenadante, ou as lamas, num método de base (de preferência um ensaio respirométrico).

As substâncias de ensaio que no presente ensaio apresentam remoções elevadas de COD não devidas a adsorção, devem ser consideradas como potencialmente biodegradáveis.

Uma remoção parcial não devida a adsorção indica que a substância é sujeita pelo menos a alguma biodegradação. Uma remoção baixa ou nula de COD pode ser devida a inibição dos microrganismos pela substância de ensaio e isto pode também ser demonstrado pela lise e perda de lamas, dando origem a sobrenadantes turvos. O ensaio deve ser repetido, utilizando um concentração mais baixa de substância de ensaio.

A utilização de um método analítico específico ou da substância de ensaio marcada com ^{14}C pode permitir uma maior sensibilidade. No caso do composto de ensaio marcado com ^{14}C, a recuperação de $^{14}CO_2$ confirmará que se verificou biodegradação.

Quando os resultados se expressam também em termos de biodegradação primária, deve ser fornecida, se possível, uma explicação relativa à alteração de estrutura química que conduz à perda de resposta da substância de ensaio original.

A validação do método analítico deve ser fornecida conjuntamente com a resposta obtida no ensaio em branco.

4. REFERÊNCIAS

(1) OCDE, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A*, Decisão C(81) 30 final do Conselho.

Apêndice 1

Ensaio L.A.S.C.: EXEMPLOS DE RESULTADOS

Substâncias	C_E (mg/l)	$C_e - C_c$ (mg/l)	Percentagem de biodegradação D_{ad}	Duração de ensaio (dias)
Sulfonato de 4-acetilaminobenzeno	17,2	2,0	85	40
Sulfonato de tetrapropilenobenzeno	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Dietilenoglicol	16,5	0,2	98,8	40
Anilina	16,9	1,7	95,9	40
Tetracarboxilato de ciclopentano	17,9	3,2	81,1	120

Apêndice 2

Exemplo de equipamento

Figura 1

