Este documento constitui um instrumento de documentação e não vincula as instituições

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

de 30 de Maio de 2008

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

(Texto relevante para efeitos do EEE)

(JO L 142 de 31.5.2008, p. 1)

Alterado por:

		Jornal Oficial		
		n.°	página	data
►**M1**	Regulamento (CE) n.º 761/2009 da Comissão de 23 de Julho de 2009	L 220	1	24.8.2009
►**M2**	Regulamento (UE) n.º 1152/2010 da Comissão de 8 de Dezembro de 2010	L 324	13	9.12.2010
►**M3**	Regulamento (UE) n.º 640/2012 da Comissão de 6 de julho de 2012	L 193	1	20.7.2012
►**M4**	Regulamento (UE) n.º 260/2014 da Comissão de 24 de janeiro de 2014	L 81	1	19.3.2014

▼B

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

de 30 de Maio de 2008

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

(Texto relevante para efeitos do EEE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de Dezembro de 2006, relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas (REACH), que cria a Agência Europeia das Substâncias Químicas, que altera a Directiva 1999/45/CE e revoga o Regulamento (CEE) n.º 793/93 do Conselho e o Regulamento (CE) n.º 1488/94 da Comissão, bem como a Directiva 76/769/CEE do Conselho e as Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE da Comissão [1], nomeadamente o n.º 3 do artigo 13.º,

Considerando o seguinte:

(1) Nos termos do Regulamento (CE) n.º 1907/2006, devem adoptar-se métodos comunitários para o ensaio de substâncias, sempre que tais métodos sejam necessários à produção de informações sobre as propriedades intrínsecas das substâncias.

(2) 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 [2] estabelece, no seu anexo V, métodos para a determinação das propriedades físico-químicas, da toxicidade e da ecotoxicidade das substâncias e preparações. O anexo V da Directiva 67/548/CEE foi revogado pela Directiva 2006/121/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, com efeitos a partir de 1 de Junho de 2008.

(3) Os métodos de ensaio constantes do anexo V da Directiva 67/548/CEE devem ser incorporados no presente regulamento.

(4) O presente regulamento não exclui a utilização de outros métodos de ensaio, desde que a mesma seja conforme com o n.º 3 do artigo 13.º do Regulamento (CE) n.º 1907/2006.

[1] JO L 396 de 30.12.2006, p. 1. Rectificação no JO L 136 de 29.5.2007, p. 3.
[2] JO 196 de 16.8.1967, p. 1. Directiva com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 2006/121/CE do Parlamento Europeu e do Conselho (JO L 396 de 30.12.2006, p. 850). Rectificação no JO L 136 de 29.5.2007, p. 281.

▼B

(5) Os princípios da substituição, redução e aperfeiçoamento da utilização de animais em procedimentos devem ser plenamente tidos em conta na concepção dos métodos de ensaio, nomeadamente sempre que se tornem disponíveis métodos adequados, validados para substituir, reduzir ou aperfeiçoar a experimentação com animais.

(6) As disposições do presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité instituído pelo artigo 133.º do Regulamento (CE) n.º 1907/2006,

ADOPTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1.º

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

Artigo 2.º

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

Artigo 3.º

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

Artigo 4.º

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

É aplicável a partir de 1 de Junho de 2008.

▼B

ANEXO

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

ÍNDICE

A.1. TEMPERATURA DE FUSÃO/CONGELAÇÃO

A.2. TEMPERATURA DE EBULIÇÃO

A.3. DENSIDADE RELATIVA

A.4. PRESSÃO DE VAPOR

A.5. TENSÃO SUPERFICIAL

A.6. SOLUBILIDADE EM ÁGUA

A.8. COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

A.9. PONTO DE INFLAMAÇÃO

A.10. INFLAMABILIDADE (SÓLIDOS)

A.11. INFLAMABILIDADE (GASES)

A.12. INFLAMABILIDADE (CONTACTO COM ÁGUA)

A.13. PROPRIEDADES PIROFÓRICAS DE SÓLIDOS E LÍQUIDOS

A.14. PROPRIEDADES EXPLOSIVAS

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

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

A.17. PROPRIEDADES OXIDANTES (SÓLIDOS)

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

A.19. TEOR EM POLÍMEROS DE BAIXA MASSA MOLECULAR

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

A.21. PROPRIEDADES DE COMBURÊNCIA (LÍQUIDOS)

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

▼M4

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

▼B

A.1. TEMPERATURA DE FUSÃO/CONGELAÇÃO

1. MÉTODO

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

1.1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

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

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

Conversão de unidades (K para^{o}C)

$t = T - 273{,}15$

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

T: temperatura termodinâmica, Kelvin (K)

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNC1A

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

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

▼B

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

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

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

1.4.1. **Método capilar**

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

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

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

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

1.4.1.3. *Detecção por célula fotoeléctrica*

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

1.4.2. **Fases quentes**

1.4.2.1. *Barra quente de Kofler*

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

▼B

1.4.2.2. *Microscópio de fusão*

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

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

1.4.2.3. *Método do menisco*

Este método é utilizado especificamente para as poliamidas.

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

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

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

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

1.4.4. **Análise térmica**

1.4.4.1. *Análise térmica diferencial (ATD)*

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

▼B

1.4.4.2. *Calorimetria de exploração diferencial (CED)*

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

1.4.5. **Ponto de fluidez**

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

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

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

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

QUADRO: APLICABILIDADE DOS MÉTODOS

A. **Métodos capilares**

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

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

▼B

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

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

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

C. **Análise térmica**

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

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

D. **Ponto de fluidez**

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

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

1.6. DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

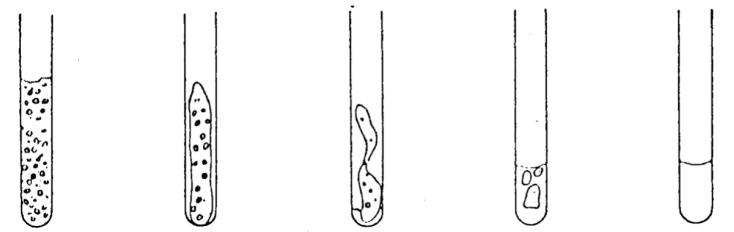
Os procedimentos de quase todos os métodos de ensaio encontram-se descritos em normas internacionais e nacionais (ver apêndice 1).

1.6.1. **Métodos com tubo capilar**

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

▼B

Figura 1



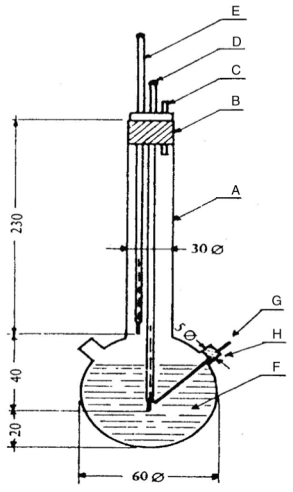
Fase A	(início da fusão): gotículas finas aderem uniformemente à parede interior do tubo capilar.
Fase B	aparece um espaço livre entre a amostra e a parede interior devido à contracção da substância fundida.
Fase C	a amostra contraída inicia a queda sobre o fundo e liquefaz-se.
Fase D	forma-se um menisco completo à superfície mas uma quantidade apreciável da amostra permanece sólida.
Fase E	(fase final da fusão): não existem quaisquer partículas sólidas.

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

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

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

Figura 2



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

▼B

Líquido do banho:

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

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

Termómetro

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

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

Procedimento:

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

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

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

Cálculo:

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

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

em que:

T = temperatura de fusão corrigida, em K;

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

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

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

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

Aparelho:

Este é constituído por:

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

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

▼B

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

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

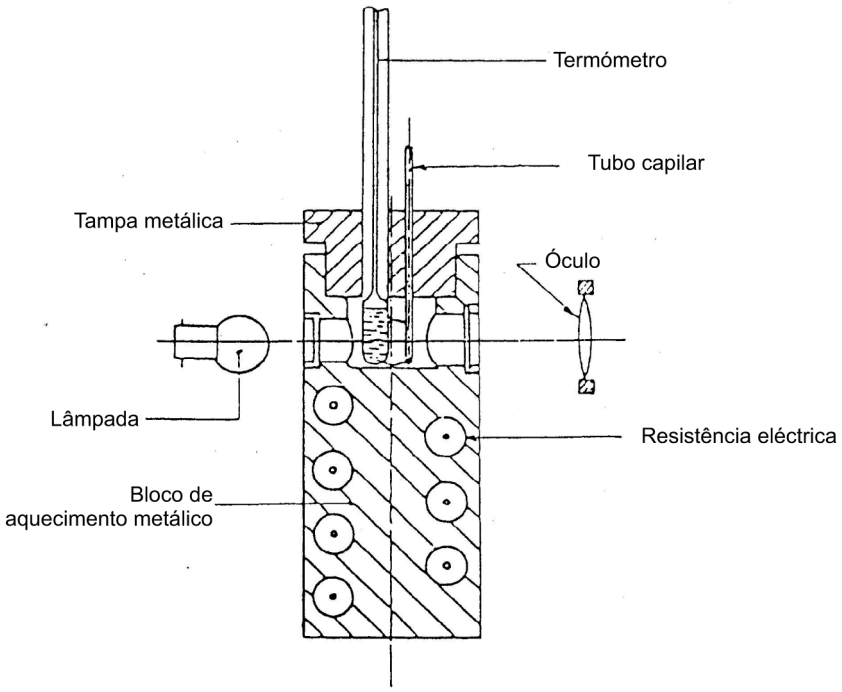
— quatro janelas de vidro resistente ao calor situadas nas paredes laterais do compartimento, dispostas diametralmente segundo ângulos rectos relativamente umas às outras. Em frente de uma destas janelas monta-se um óculo para observação do tubo capilar. As outras três janelas são utilizadas para iluminar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

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

Termómetro

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

Figura 3



1.6.1.3. *Detecção por célula fotoeléctrica*

Aparelho e procedimento:

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

▼B

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

1.6.2. **Fases quentes**

1.6.2.1. *Barra quente de Kofler*

Ver apêndice.

1.6.2.2. *Microscópio de fusão*

Ver apêndice.

1.6.2.3. *Método do menisco (poliamidas)*

Ver apêndice.

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

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

Ver apêndice.

1.6.4. **Análise térmica**

1.6.4.1. *Análise térmica diferencial*

Ver apêndice.

1.6.4.2. *Calorimetria de exploração diferencial*

Ver apêndice.

1.6.5. **Determinação do ponto de fluidez**

Ver apêndice.

2. **RESULTADOS**

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

3. **RELATÓRIO**

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

— método utilizado,

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

— uma estimativa da precisão.

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

▼B

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

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

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

4. **REFERÊNCIAS**

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

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

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

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

▼B

Apêndice

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

1. **Métodos capilares**

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

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

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

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

2. **Fases quentes**

2.1. Barra quente de Kofler

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

2.2. Microscópio de fusão

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen.

2.3. Método do menisco (poliamidas)

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

▼B

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

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

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

4. **Análise térmica**

4.1. Análise térmica diferencial

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

▼B

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

4.2. Calorimetria de exploração diferencial

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

5. **Determinação do ponto de fluidez**

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

▼B

A.2. TEMPERATURA DE EBULIÇÃO

1. MÉTODO

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

1.1. INTRODUÇÃO

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

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

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

Observações

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

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

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

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

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

em que:

p = pressão de vapor da substância em pascal

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

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

T = temperatura termodinâmica em K

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

▼B

Conversões

Pressão (unidades: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

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

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

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

1 atm = atmosfera padrão = 101,325 Pa

(a unidade «atm» não é permitida)

Temperatura (unidades: K)

$t = T - 273,15$

t: temperatura de Celsius, graus Celsius (°C)

T: temperatura termodinâmica, kelvin (K)

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

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

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

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

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

1.4.1. **Determinação utilizando o ebuliómetro**

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

1.4.2. **Método dinâmico**

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

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

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

▼B

1.4.4. **Método de Siwoloboff**

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

1.4.5. **Detecção por célula fotoeléctrica**

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

1.4.6. **Análise térmica diferencial**

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

1.4.7. **Calorimetria de exploração diferencial**

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

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

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

Quadro 1

Comparação dos métodos

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

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

▼B

1.6. DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

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

1.6.1. **Ebuliómetro**

Ver apêndice.

1.6.2. **Método dinâmico**

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

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

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

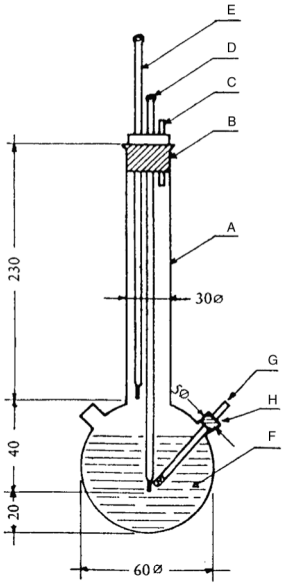
Ver apêndice.

1.6.4. **Método de Siwoloboff**

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

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

Figura 1



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

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

▼B

Figura 2

Princípio de Siwoloboff

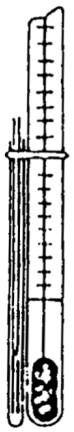
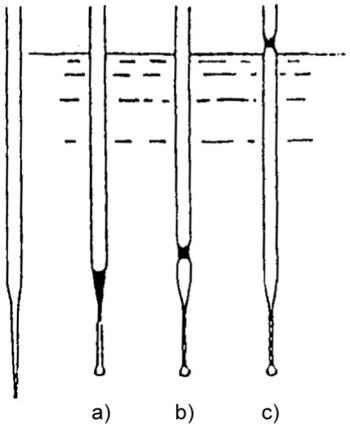


Figura 3

Princípio modificado



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

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

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

1.6.5. **Detecção por célula fotoeléctrica**

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

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

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

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

▼B

1.6.6. **Análise térmica**

1.6.6.1. *Análise térmica diferencial*

Ver apêndice.

1.6.6.2. *Calorimetria de exploração diferencial*

Ver apêndice.

2. **RESU LTADOS**

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

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

em que:

Δp = (101,325 - p) [atenção ao sinal]

p = pressão medida em kPa

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

T = temperatura de ebulição medida em K

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

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

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

Quadro 2

Temperatura — factores de correcção f_T

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

▼B

3. **RELATÓRIO**

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

— método utilizado,

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

— uma estimativa da precisão.

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

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

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

4. **REFERÊNCIAS**

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

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

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

▼B

Apêndice

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

1. **Ebuliómetro**

1.1 Dispositivos de medição da temperatura de fusão com banho líquido

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

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

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

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

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

▼B

A.3. DENSIDADE RELATIVA

1. MÉTODO

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

1.1. INTRODUÇÃO

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

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

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

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

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

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA (1) (3)

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

1.4. PRINCÍPIO DOS MÉTODOS

Recorre-se à utilização de quatro classes de métodos.

1.4.1. **Métodos de flutuação**

1.4.1.1. *Hidrómetro (para substâncias líquidas)*

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

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

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

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

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

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

▼B

1.4.2. **Métodos do picnómetro**

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

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

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

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

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

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

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

1.6. DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

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

Os testes devem ser efectuados à temperatura de 20 ºC e deverão ser realizadas pelo menos duas medições.

2. **RESULTADOS**

Ver normas.

3. **RELATÓRIO**

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

— método utilizado,

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

A densidade relativa D_4^{20} deverá constar do relatório conforme definido em 1.2, em conjunto com o estado físico da substância ensaiada.

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

▼B

Quadro

Aplicabilidade dos métodos

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

4. **REFERÊNCIAS**

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

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

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

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

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

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

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

▼B

Apêndice

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

1. **Métodos de flutuação**

1.1. Hidrómetro

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

1.2. Balança hidrostática

Para as substâncias sólidas

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

Para substâncias líquidas

ISO 901	ISO 758

▼B

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

1.3. Método do corpo imerso

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

2. **Métodos picnométricos**

2.1. Para substâncias líquidas

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

▼B

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

▼B

2.2. Para substâncias sólidas

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

3. **Picnómetro por comparação ao ar**

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

▼M1

A.4. PRESSÃO DE VAPOR

1. MÉTODO

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

1.1. INTRODUÇÃO

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

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

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

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

Quadro 1

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

(1) Utilizando um manómetro de capacitância.

1.3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

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

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

onde:

p = pressão de vapor, em Pascal

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

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

T = temperatura, em K

▼M1

1.4. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

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

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

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

1.5.1.1. *Princípio*

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

Figura 1

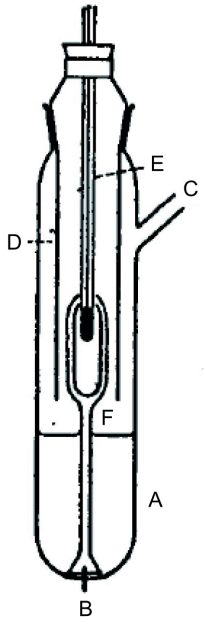
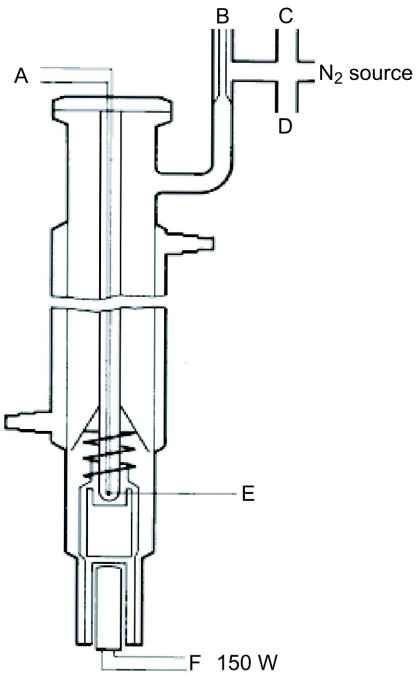


Figura 2



▼M1

Bomba de Cottrell (4)

A: Termopar

B: Volume tampão de vácuo

C: Manómetro

D: Vácuo

E: Ponto de medição

F: Resistência, cerca de 150 W

1.5.1.2. *Equipamento*

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

1.5.1.3. *Procedimento*

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

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

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

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

1.5.2. **Método estático**

1.5.2.1. *Princípio*

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

▼M1

1.5.2.2. *Equipamento*

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

1.5.2.3. *Procedimento*

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

Figura 3a

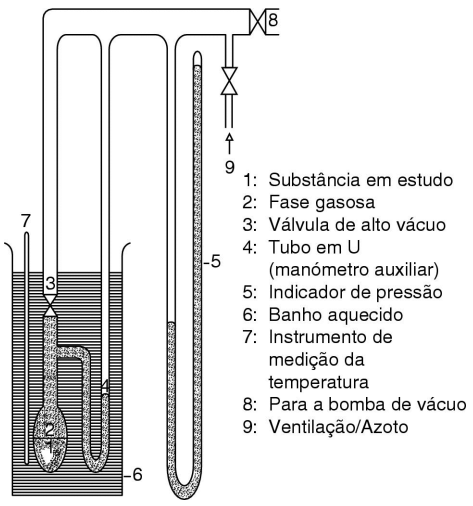
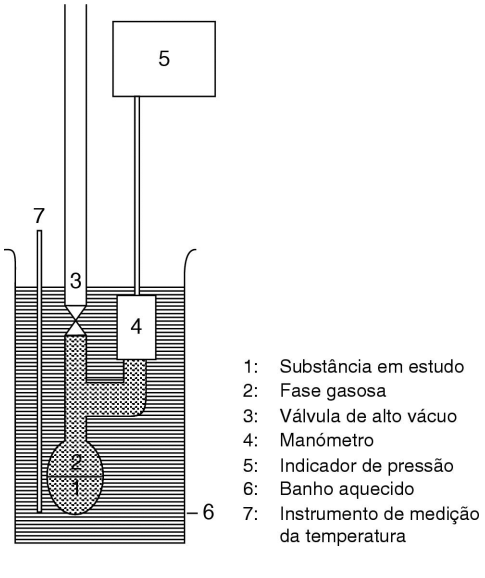


Figura 3b



▼M1

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

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

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

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

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

1.5.3. **Método do isoteniscópio**

1.5.3.1. *Princípio*

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

1.5.3.2. *Equipamento*

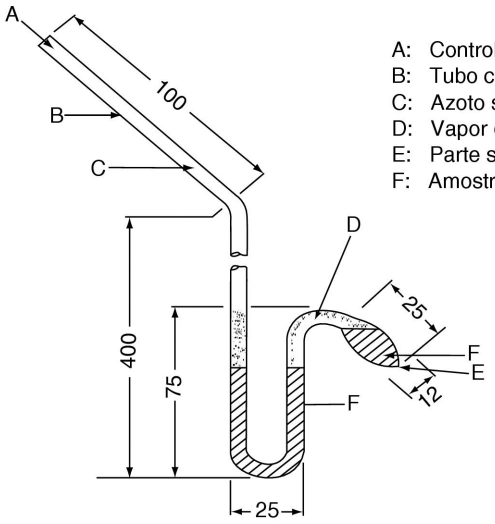
A figura 4 mostra um exemplo típico de dispositivo de medição. A descrição completa pode ser consultada no ATSM D 2879-86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3. *Procedimento*

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

Figura 4



(Dimensões em milímetros)

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

▼M1

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

1.5.4.1. *Princípio*

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

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

onde:

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

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

T = temperatura (K)

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

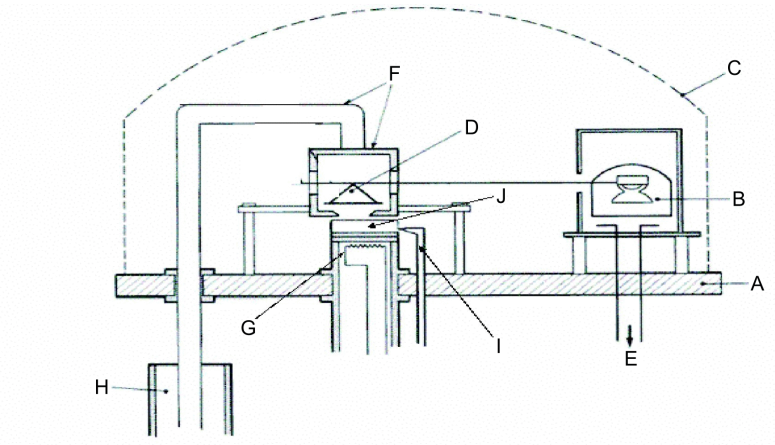
P = pressão de vapor (Pa)

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

1.5.4.2. *Equipamento*

O princípio geral do aparelho é ilustrado na figura 5.

Figura 5



A: Base plate
B: Moving coil instrument
C: Bell jar
D: Balance with scale pan
E: Vacuum measuring device
F: Refrigeration box and cooling bar
G: Evaporator furnace
H: Dewar flask with liquid nitrogen
I: Measurement of temperature of sample
J: Test Substance

▼M1

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

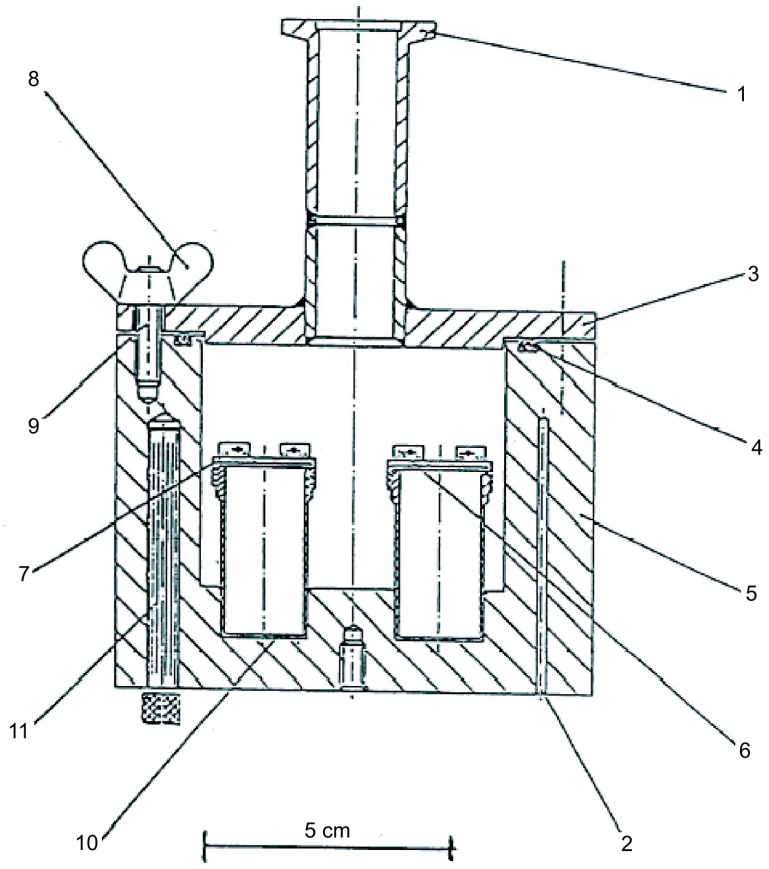
1.5.5.1. *Princípio*

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

1.5.5.2. *Equipamento*

O princípio geral do aparelho é ilustrado na figura 6.

Figura 6



1: Connection to vacuum

2: Wells from platinum resistance thermometer or temperature measurement and control

3: Lid for vacuum tank

4: O-ring

5: Aluminum vacuum tank

6: Device for installing and removing the effusion cells

7: Threaded lid

8: Butterfly nuts

9: Bolts

10: Stainless steel effusion cells

11: Heater cartridge

▼M1

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

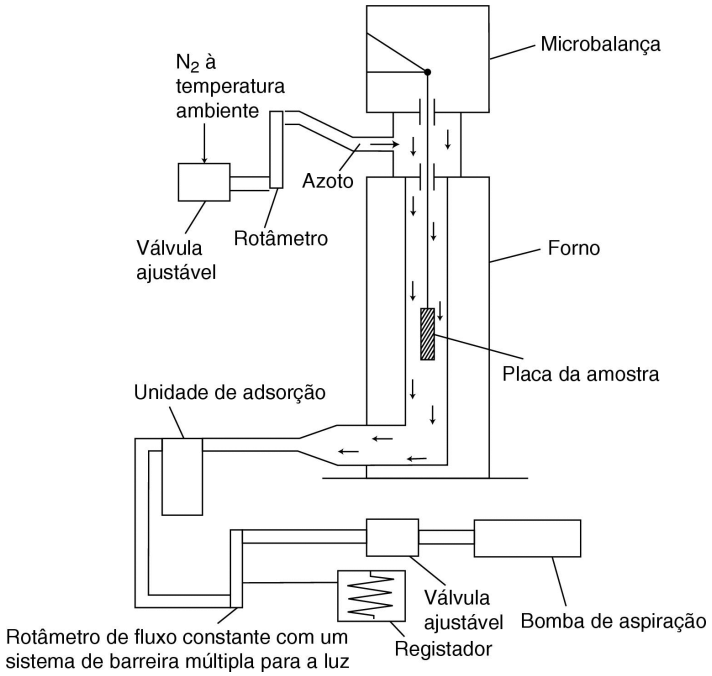
1.5.6.1. *Princípio*

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

1.5.6.2. *Equipamento*

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

Figura 7



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

1.5.6.3. *Procedimento*

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

▼M1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5.7.1. *Princípio*

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

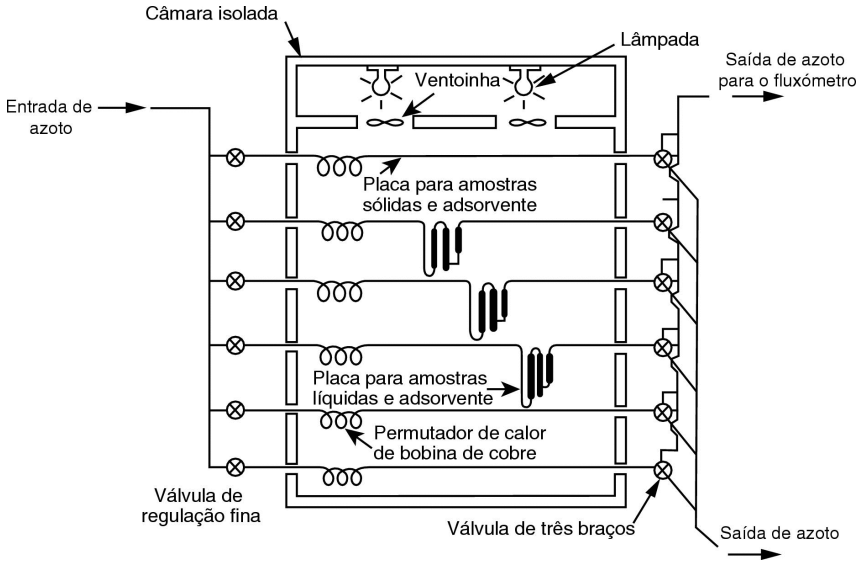
O procedimento de saturação dos gases é aplicável a substâncias químicas líquidas ou sólidas. Pode ser utilizado para pressões de vapor superiores a 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). O método é mais fiável para as pressões de vapor inferiores a 10^3 Pa. Acima dos 10^3 Pa, as pressões de vapor são geralmente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

1.5.7.2. *Equipamento*

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

▼M1

Figura 8



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

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

Figura 9

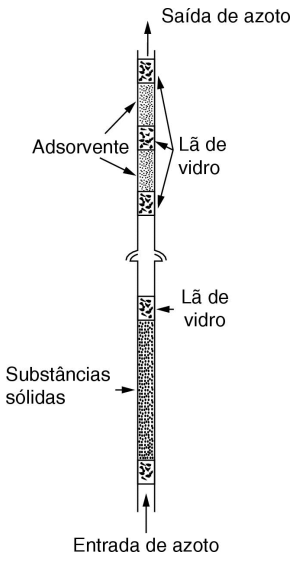
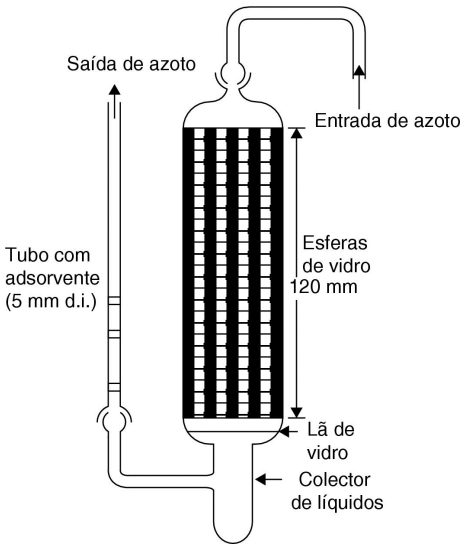


Figura 10



▼M1

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

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

1.5.7.3. *Procedimento*

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

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

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

A pressão de vapor é calculada pela seguinte equação:

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

onde:

p = pressão de vapor (Pa)

W = massa da substância em estudo evaporada (g)

V = volume de gás saturado (m^3)

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

T = temperatura (K)

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

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

▼M1

1.5.8. **Método de rotação**

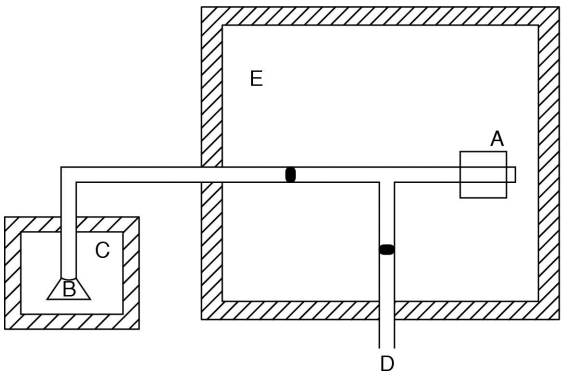
1.5.8.1. *Princípio*

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

1.5.8.2. *Equipamento*

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

Figura 11



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

2. **DADOS E RELATÓRIOS**

2.1. DADOS

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

2.2. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

— método utilizado,

▼M1

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

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

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

— todos os dados originais,

— a curva de log p em função de 1/T,

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

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

— natureza da alteração,

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

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

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

3. **BIBLIOGRAFIA**

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

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

▼M1

Apêndice

Método de estimação

INTRODUÇÃO

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

— decidir qual o método experimental mais apropriado,

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

MÉTODO DE ESTIMAÇÃO

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

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

PROCEDIMENTO DE CÁLCULO

A pressão de vapor é calculada do seguinte modo:

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

onde:

T = temperatura de interesse

T_b = ponto de ebulição normal

P_{VP} = pressão de vapor à temperatura T

ΔH_{Vb} = calor de vaporização

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

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

Para além do que,

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

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

▼**M1**

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

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

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

RELATÓRIO

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

BIBLIOGRAFIA

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

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

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

▼B

A.5. TENSÃO SUPERFICIAL

1. MÉTODO

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

1.1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

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

A tensão superficial é dada por:

N/m (unidade do SI) ou

mN/m (subunidade do SI)

1 N/m = 10^3 dines/cm

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

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

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

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

1.4. PRINCÍPIO DOS MÉTODOS

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

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

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

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

▼B

1.6. DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

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

1.6.1. **Método da placa**

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

1.6.2. **Método do colchete**

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

1.6.3. **Método do anel**

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

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

1.6.4.1. *Aparelho*

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

— mesa de amostra móvel,

— sistema de medição de força,

— corpo para medição (anel),

— recipiente de medição.

1.6.4.1.1. Mesa de amostra móvel

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

1.6.4.1.2. Sistema de medição de força

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

▼B

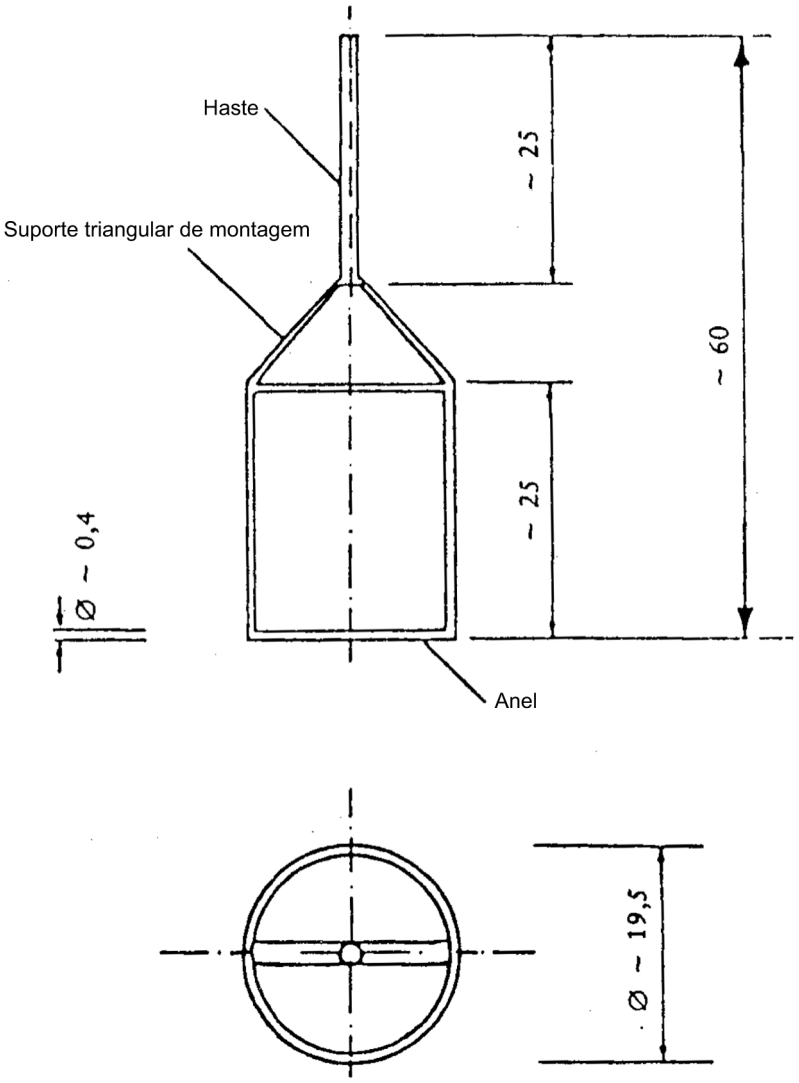
1.6.4.1.3. Corpo para a medição (anel)

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

Figura

Corpo para a medição

(Todas as dimensões estão expressas em milímetros)



1.6.4.1.4. Recipiente de medição

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

▼B

1.6.4.2. *Preparação do equipamento*

1.6.4.2.1. Limpeza

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

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

Nota:

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

1.6.4.2.2. Calibração do aparelho

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

Montagem:

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

Ajustamento do zero:

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

Calibrações:

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

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

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

em que:

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

m = massa do cavaleiro (g)

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

b = perímetro médio do anel (cm)

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

▼B

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

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

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

em que:

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

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

1.6.4.3. *Preparação de amostras*

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

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

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

1.6.5. **Condições do teste**

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

1.6.6. **Realização do teste**

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

▼B

2. **RESULTADOS**

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

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

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

Tabela

Correcção da tensão superficial medida

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

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

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

▼B

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

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

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

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

em que:

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

R = raio do anel

f = factor de correcção (1)

3. RELATÓRIO

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

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

— método utilizado,

— tipo de água ou de solução utilizada,

— especificação exacta da substância (identificação e impurezas),

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

▼B

— concentração da solução,

— temperatura do teste,

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

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

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

3.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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

4. **REFERÊNCIAS**

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

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

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

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

▼M4

A.6. **SOLUBILIDADE EM ÁGUA**

INTRODUÇÃO

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

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

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

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

DEFINIÇÕES E UNIDADES

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

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

PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA

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

DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

Condições de realização dos ensaios

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

Ensaio preliminar

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

▼M4

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

Quadro 1

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

Método de eluição em coluna

Princípio

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

Material e aparelhagem

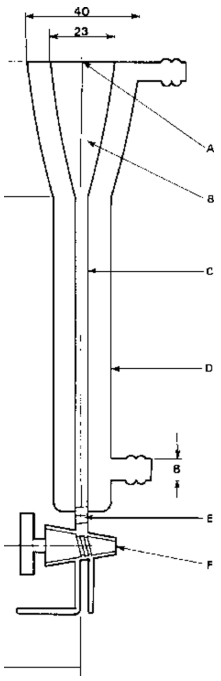
10. É necessária uma microcoluna (figura 1) mantida a temperatura constante, ligada a uma bomba de recirculação (figura 2) ou a um reservatório de nível (figura 3). O enchimento inerte que a microcoluna contém é mantido no lugar por um pequeno tampão de fibra de vidro, que também serve para reter as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

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

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

▼**M4**

Figura 1



Dimensões em mm

A. Junta de vidro esmerilado

B. Parte superior

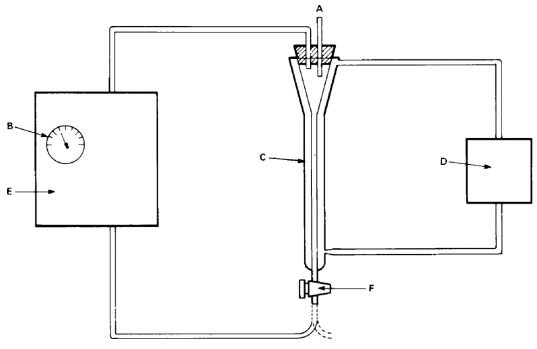
C. Diâmetro interior (5)

D. Diâmetro exterior (19)

E. Tampão de fibra de vidro

F. Torneira

Figura 2



A. Saída para equilíbrio atmosférico

B. Medidor de caudal

C. Microcoluna

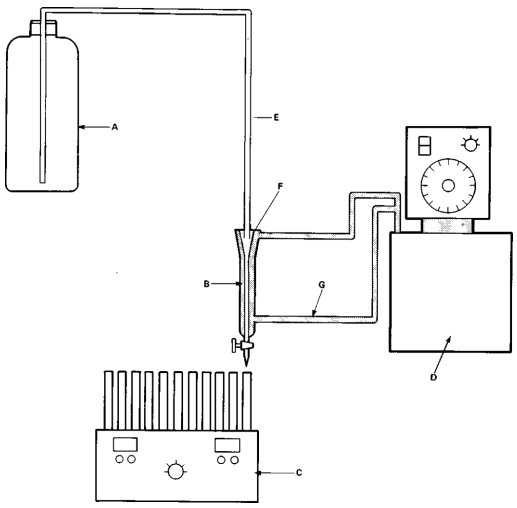
D. Bomba de circulação termostatizada

E. Bomba de recirculação

F. Torneira de duas vias para recolha das amostras

▼M4

Figura 3



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

B. Coluna

C. Recetor de frações

D. Termóstato

E. Tubagem de *Teflon*

F. Junta de vidro esmerilado

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

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

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

Processo com bomba de recirculação

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

▼M4

Processo com reservatório de nível

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

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

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

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

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

Método do balão

Princípio

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

Material e aparelhagem

22. É necessário o seguinte:

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

— dispositivo para agitação das soluções em condições termostáticas,

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

— equipamento de análise.

Procedimento

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

▼M4

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

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

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

Determinações analíticas

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

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

Método de eluição em coluna

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

Método do balão

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

Relatório dos ensaios

Método de eluição em coluna

29. Elementos a constar do relatório dos ensaios:

— resultados do ensaio preliminar,

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

— concentração, caudal e pH correspondentes a cada amostra,

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

— média de, pelo menos, duas séries consecutivas,

— temperatura da água durante o processo de saturação,

— método de análise,

— material de enchimento,

— impregnação do material de enchimento,

— solvente utilizado,

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

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

▼**M4**

Método do balão

30. Elementos a constar do relatório dos ensaios:

— resultados do ensaio preliminar,

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

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

— pH de cada amostra,

— média dos valores correspondentes aos balões concordantes,

— temperatura do ensaio,

— método analítico,

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

▼B

A.8 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

1. MÉTODO

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

1.1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

1.2. DEFINIÇÃO E UNIDADES

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

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

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

▼B

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Método do frasco agitado

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

Método de HPLC

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

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

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

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

1.4.1. **Método do frasco agitado**

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

1.4.2. **Método de HPLC**

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

▼B

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

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

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

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.5.1. **Repetitividade**

Método do frasco agitado

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

Método de HPLC

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

1.5.2. **Sensibilidade**

Método do frasco agitado

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

Método de HPLC

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

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

▼B

1.5.3. **Especificidade**

Método do frasco agitado

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

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

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

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

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

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

1.6.2. **Método do frasco agitado**

1.6.2.1. *Preparação*

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

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

Nota:

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

1.6.2.1.1. Pré-saturação dos solventes

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

▼B

1.6.2.1.2. Preparação para o ensaio

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

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

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

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

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

1.6.2.1.3. Substância a testar

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

1.6.2.2. *Condições de ensaio*

A temperatura de ensaio deverá ser mantida constante (± 1 ºC) e estar compreendida no intervalo entre 20 e 25 ºC.

1.6.2.3. *Procedimento de medição*

1.6.2.3.1. Estabelecimento do equilíbrio de partição

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

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

1.6.2.3.2. Separação de fases

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

▼B

1.6.2.4. *Análise*

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

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

— métodos fotométricos,

— cromatografia gasosa,

— cromatografia líquida de elevado rendimento (HPLC).

1.6.3. **Método de HPLC**

1.6.3.1. *Preparação*

Aparelho

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

Fase móvel

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

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

▼B

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

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

Solutos

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

Condições de ensaio

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

1.6.3.2. ***Medição***

Cálculo do tempo limite t_o

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

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

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

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

▼B

Gráfico de calibração

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

Determinação do factor de capacidade da substância de ensaio

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

2. **RESULTADOS**

Método do frasco agitado

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

3. **RELATÓRIO**

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

— especificação exacta da substância (identificação e impurezas),

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

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

Para o caso do método do frasco agitado:

— o resultado da estimativa preliminar, se existir,

— temperatura da determinação,

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

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

▼B

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

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

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

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

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

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

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

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

Para o caso do método de HPLC:

— o resultado da estimativa preliminar, se existir,

— substâncias de ensaio e de referência e sua pureza,

— intervalo de temperaturas das determinações,

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

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

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

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

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

— descrição do equipamento e condições de funcionamento,

— perfil de eluição,

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

— tempo limite e método para a sua medição.

▼B

4. **REFERÊNCIAS**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

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

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

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

▼B

Apêndice 1

Métodos de cálculo/estimação

INTRODUÇÃO

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

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

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

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

— como verificação interna laboratorial sobre possíveis erros experimentais,

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

MÉTODO DE ESTIMAÇÃO

Estimativa preliminar do coeficiente de partição

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

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

MÉTODOS DE CÁLCULO

Princípio dos métodos de cálculo

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

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

Critérios de qualidade

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

▼B

Procedimentos de cálculo

Método π de Hansch

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

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

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

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

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

Método de Rekker

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

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

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

Método de Hansch-Leo

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

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

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

Método combinado

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

Observações

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

▼B

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

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

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

Relatório

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

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

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

— descrição do método de cálculo,

— identificação ou fonte da base de dados,

— peculiaridades na escolha dos fragmentos,

— documentação compreensiva relativa aos cálculos.

BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

Apêndice 2

Substâncias de referência recomendadas para o método de HPLC

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

▼B

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

▼B

A.9. PONTO DE INFLAMAÇÃO

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

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

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

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

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

Unidades: ºC

$t = T - 273{,}15$

(t em ºC e T em K)

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

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

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

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

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.5.1. **Repetitividade**

A repetitividade varia de acordo com o intervalo de pontos de inflamação e com o método de ensaio utilizado; máximo 2 ºC.

1.5.2. **Sensibilidade**

A sensibilidade depende do método de ensaio utilizado.

1.5.3. **Especificidade**

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

▼B

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1. **Preparações**

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

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

1.6.2. **Condições de ensaio**

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

1.6.3. **Realização do ensaio**

1.6.3.1. *Método de equilíbrio*

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

1.6.3.2. *Método de não equilíbrio*

Aparelho de Abel:

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

Aparelho de Abel-Pensky:

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

Aparelho de Tag:

Ver ASTM D 56.

Aparelho de Pensky-Martens:

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

Observações:

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

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

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

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

▼B

2. **RESULTADOS**

3. **RELATÓRIO**

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

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

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

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

4. **REFERÊNCIAS**

Nenhuma.

▼B

A.10. INFLAMABILIDADE (SÓLIDOS)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

1.2. DEFINIÇÃO E UNIDADES

O tempo de combustão exprime-se em segundos.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Não especificadas.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

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

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Não especificados.

▼B

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1. **Ensaio preliminar**

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

1.6.2. **Ensaio da velocidade de combustão**

1.6.2.1. *Preparação*

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

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

1.6.2.2. *Condições de ensaio*

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

1.6.2.3. *Realização do ensaio*

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

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

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

▼B

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

2. **RESULTADOS**

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

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

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

— especificação exacta da substância (identificação e impurezas),

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

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

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

3.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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

4. **REFERÊNCIAS**

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

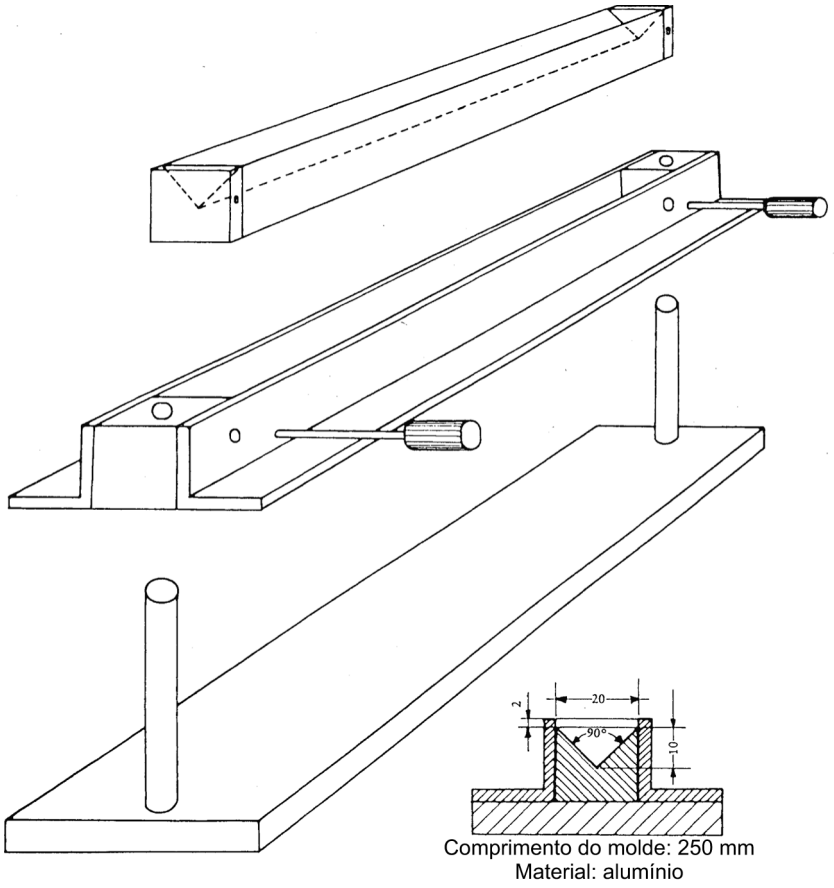
▼B

Apêndice

Figura

Molde e acessórios para a preparação da pilha

(Todas as dimensões estão em milímetros)



Comprimento do molde: 250 mm
Material: alumínio

▼B

A.11. INFLAMABILIDADE (GASES)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

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

1.2. DEFINIÇÃO E UNIDADES

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

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Não especificadas.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

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

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Não especificados.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1. **Aparelho**

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

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

1.6.2. **Condições de ensaio**

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

▼B

1.6.3. **Realização do ensaio**

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

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

2. **RESULTADOS**

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

3. **RELATÓRIO**

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

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

— uma descrição, com dimensões, do aparelho utilizado,

— a temperatura a que se efectuou o ensaio,

— as concentrações de ensaio e os resultados obtidos,

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

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

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

4. **REFERÊNCIAS**

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

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

▼B

A.12. INFLAMABILIDADE (CONTACTO COM ÁGUA)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

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

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

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

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

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

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

1.3.1. **Passo 1**

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

1.3.2. **Passo 2**

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

1.3.3. **Passo 3**

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

1.3.4. **Passo 4**

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

▼B

1.4. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Não especificadas.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Não especificados.

1.6. DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

1.6.1. **Passo 1**

1.6.1.1. *Condições de ensaio*

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

1.6.1.2. *Realização do ensaio*

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

1.6.2. **Passo 2**

1.6.2.1. *Aparelho*

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

1.6.2.2. *Condições de ensaio*

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

1.6.2.3. *Realização do ensaio*

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

1.6.3. **Passo 3**

1.6.3.1. *Condições de ensaio*

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

1.6.3.2. *Realização do ensaio*

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

▼B

1.6.4. **Passo 4**

1.6.4.1. *Aparelho*

O aparelho tem a configuração que se mostra na figura.

1.6.4.2. *Condições de ensaio*

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

1.6.4.3. *Realização do ensaio*

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

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

2. **RESULTADOS**

A substância é considerada perigosa se:

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

ou

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

3. **RELATÓRIO**

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

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

— pormenores sobre qualquer preparação inicial da substância de ensaio,

▼B

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

— a identidade química do gás libertado,

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

— quaisquer observações adicionais relevantes para a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

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

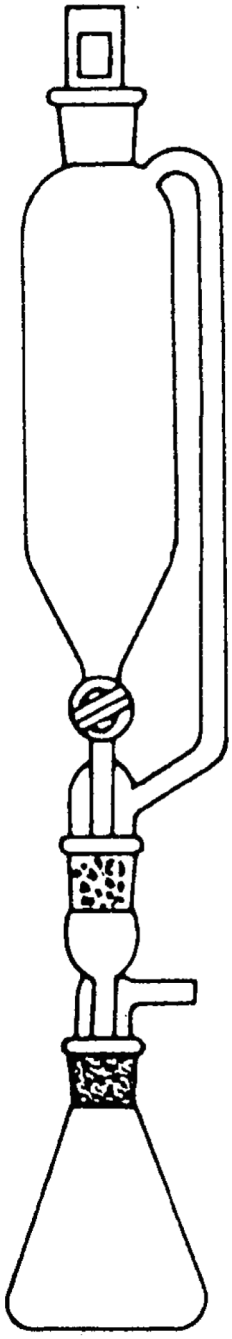
(2) NF T 20-040 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Apêndice

Figura

Aparelho



▼B

A.13 **PROPRIEDADES PIROFÓRICAS DE SÓLIDOS E LÍQUIDOS**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

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

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

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

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

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

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Não especificadas.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

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

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

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

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Aparelho**

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

Nota:

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

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

▼B

1.6.2. **Realização do ensaio**

a) *Sólidos pulverulentos*

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

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

b) *Líquidos*

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

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

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

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

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

2.2. AVALIAÇÃO

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

3. **RELATÓRIO**

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

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

— os resultados dos ensaios,

— quaisquer observações adicionais relevantes para a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

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

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

▼B

A.14. **PROPRIEDADES EXPLOSIVAS**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

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

O método decompõe-se em três partes:

a) Um ensaio de sensibilidade térmica (1);

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

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

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

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

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

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

Explosivo:

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

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

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

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

▼B

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

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

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

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

1.4.2. **Sensibilidade térmica**

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

1.4.3. **Sensibilidade mecânica (choque)**

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

14.4. **Sensibilidade mecânica (fricção)**

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

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Não especificados.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

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

1.6.1.1. *Aparelho*

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

▼B

1.6.1.2. *Condições de ensaio*

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

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

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

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

1.6.1.3. *Realização dos ensaios*

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

▼B

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

1.6.1.4. *Avaliação*

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

1.6.2. **Sensibilidade mecânica (choque)**

1.6.2.1. *Aparelho (figura 4)*

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

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

1.6.2.2. *Condições de ensaio*

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

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

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

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

▼B

1.6.2.3. *Realização dos ensaios*

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

1.6.2.4. *Avaliação*

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

1.6.3. **Sensibilidade mecânica (fricção)**

1.6.3.1. *Aparelho (figura 5)*

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

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

1.6.3.2. *Condições de ensaio*

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

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

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

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

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

▼B

1.6.3.3. *Realização dos ensaios*

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

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

1.6.3.4. *Avaliação*

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

2. **RESULTADOS**

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

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

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

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

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

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

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

— os resultados de cada tipo de ensaio,

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

▼B

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

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

3.2. INTERPRETAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

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

4. **REFERÊNCIAS**

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

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

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

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

▼B

Apêndice

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

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

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

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

Figura 1

Aparelho para o ensaio da sensibilidade térmica

(Todas as dimensões estão em milímetros)

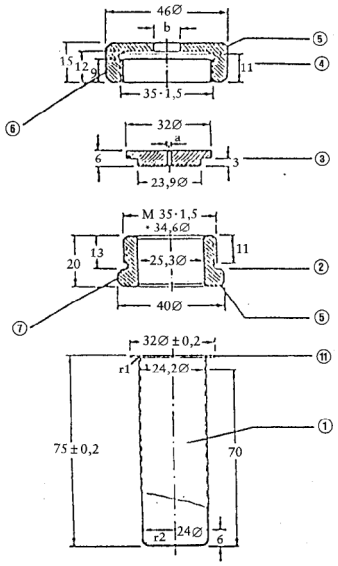


Figura 1a Tubo de aço e acessórios

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

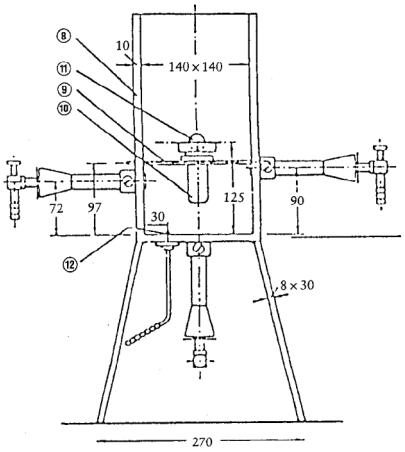


Figura 1b Dispositivo de aquecimento e protecção

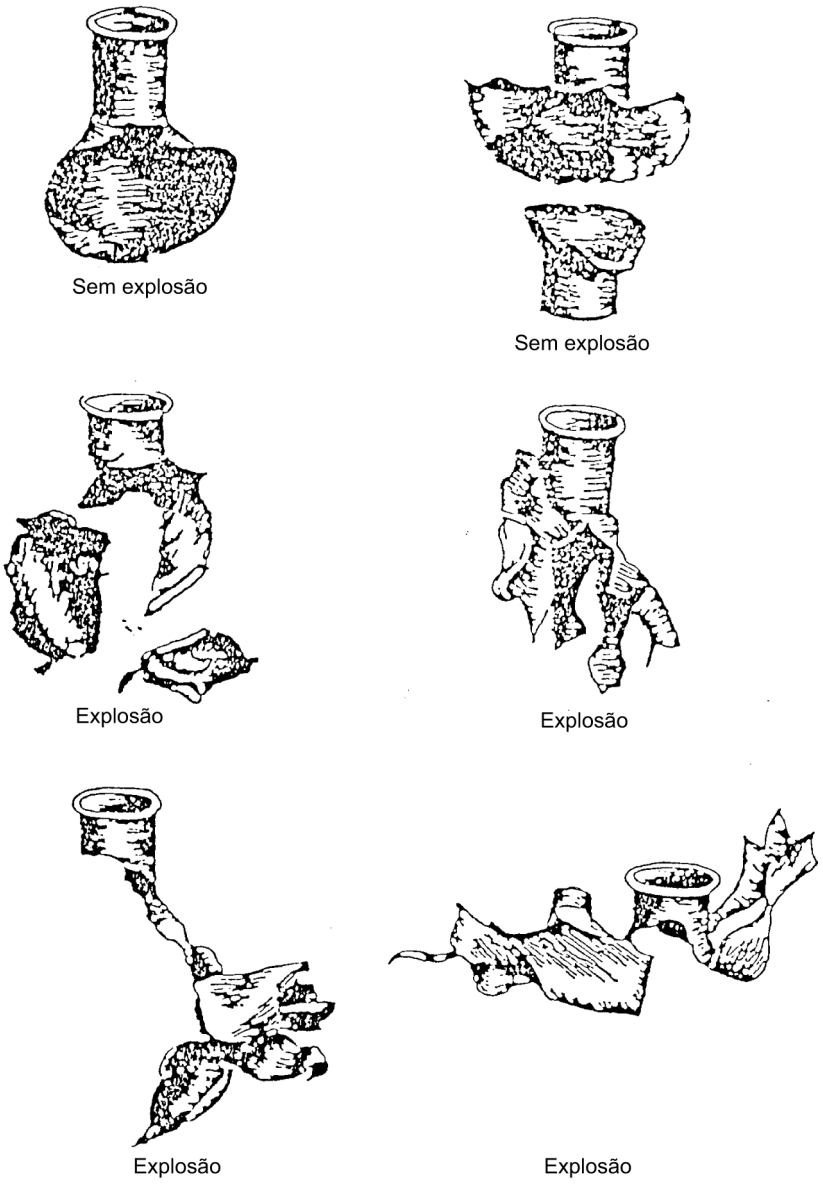
(7) 2 cabeças chatas para chave 36
(8) caixa à prova de estilhaços
(9) 2 tirantes de suporte para tubo
(10) tubo montado
(11) posição do queimador posterior: os outros queimadores estão visíveis
(12) jacto orientador

▼B

Figura 2

Ensaio de sensibilidade térmica

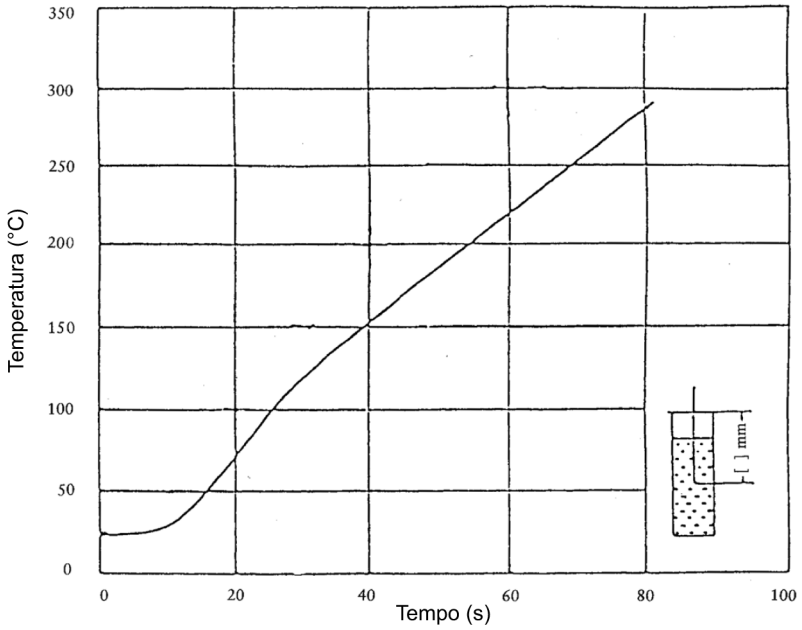
Exemplos de fragmentação



▼B

Figura 3

Calibração da taxa de aquecimento para o ensaio da sensibilidade térmica



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

▼B

Figura 4

Aparelho para o ensaio de choque

(Todas as dimensões estão em milímetros)

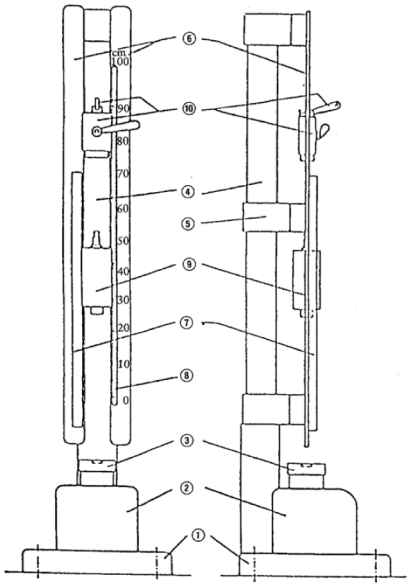


Figura 4a Martelo cadente, alçado e vista geral

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

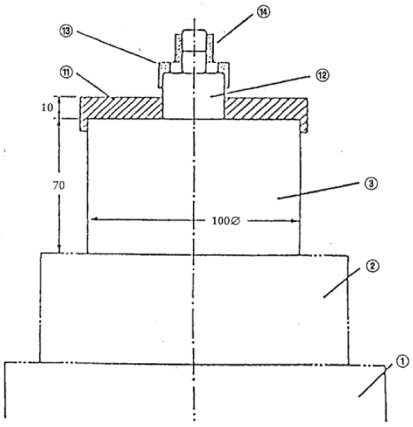


Figura 4b Martelo cadente, parte lateral vista lateral,

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

▼B

Figura 4

Continuação

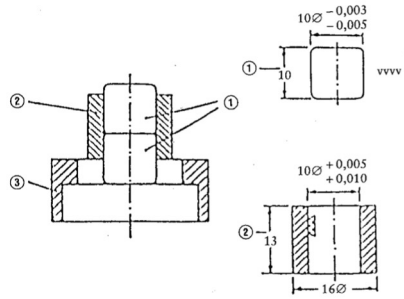


Figura 4c Dispositivo para o ensaio de choque de substâncias pulverizadas ou pastas

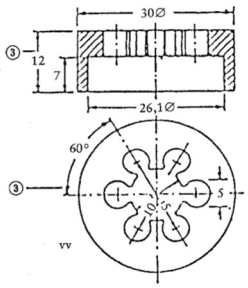
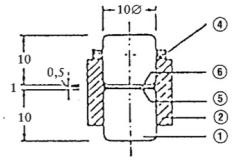


Figura 4d Dispositivo para o ensaio de choque de substâncias líquidas

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



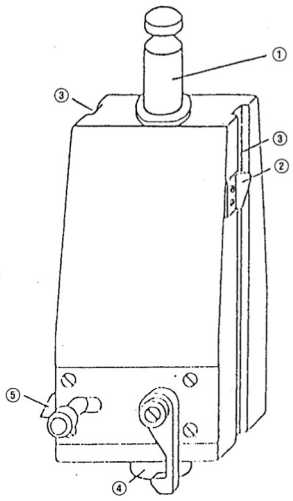


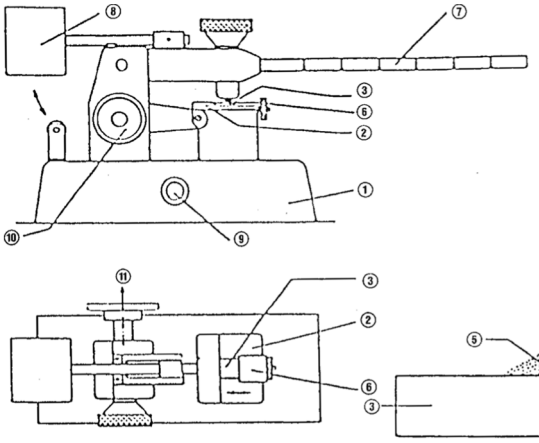
Figura 4e Martelo (massa cadente de 5 kg)

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

▼B

Figura 5

Sensibilidade à fricção: aparelho



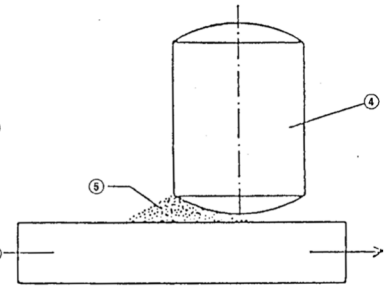


Figura 5a Aparelho de fricção: alçado e planta

Figura 5b Posição de arranque da cavilha na amostra

(1) base de aço
(2) carro móvel
(3) placa de porcelana, 25 x 25 x 5 mm, presa ao carro
(4) cavilha fixa de porcelana, 10 mm de diâmetro x 15 mm
(5) amostra de ensaio, aproximadamente 10 mm^3
(6) suporte da cavilha
(7) braço de carga
(8) contrapeso
(9) interruptor
(10) roda para alinhar o carro na posição de partida
(11) saída para o motor eléctrico

▼B

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

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

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

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

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

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

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

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

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

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

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

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

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

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1. **Aparelho**

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

1.6.2. **Condições de ensaio**

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

1.6.3. **Realização do ensaio**

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

▼B

2. **RESULTADOS**

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

3. **RELATÓRIO**

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

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

— a quantidade de amostra utilizada,

— a pressão atmosférica,

— o aparelho utilizado,

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

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

4. **REFERÊNCIAS**

Nenhuma.

▼B

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

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

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

O objectivo deste ensaio consiste em proporcionar informação preliminar sobre a auto-inflamabilidade de substâncias sólidas a temperaturas elevadas.

Se o calor desenvolvido por reacção da substância com oxigénio ou por decomposição exotérmica não for perdido para o meio envolvente com rapidez suficiente, ocorre o fenómeno de auto-aquecimento que conduz à auto-ignição. Em consequência, a auto-ignição ocorre sempre que a razão de produção de calor excede a razão da perda de calor.

O procedimento de ensaio é útil como pesquisa preliminar para as substâncias sólidas. Dada a natureza complexa da ignição e da combustão de sólidos, a temperatura de auto-ignição determinada de acordo com este método apenas deverá ser utilizada para efeitos de comparação.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

A temperatura de auto-ignição obtida por este método é a temperatura ambiente mínima expressa em^{o}C à qual se inflamará um determinado volume de substância sob condições definidas.

1.3. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Coloca-se num forno, à temperatura ambiente, um determinado volume de substância a ensaiar; traça-se uma curva temperatura/tempo relativa às condições no centro da amostra, aumentando-se a temperatura do forno até 400^{o}C ou até ao ponto de fusão da substância se for menor, à razão de 0,5^{o}C/minuto. Para os objectivos deste ensaio, a temperatura do forno para a qual a temperatura da amostra é de 400^{o}C por auto-aquecimento é designada por temperatura de auto--ignição.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Nenhum.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1. **Aparelho**

1.6.1.1. *Forno*

Utiliza-se um forno de laboratório de temperatura programada (com o volume aproximado de dois litros) equipado com sistema de circulação de ar natural e com sistema para aliviar os efeitos da explosão. No sentido de se evitar um potencial risco de explosão, não se deverá permitir que quaisquer gases de decomposição estabeleçam contacto com os componentes eléctricos do sistema de aquecimento.

▼B

1.6.1.2. *Cubo de rede de arame*

De acordo com o diagrama da figura 1 prepara-se uma peça de rede de arame de aço inoxidável com aberturas de 0,045 mm. A rede deverá ser dobrada e presa com arame no interior de cubos abertos por cima.

1.6.1.3. *Termopares*

Termopares adequados.

1.6.1.4. *Registador*

Utiliza-se qualquer registador de dois canais calibrado de 0 a 600ºC ou calibrado para a tensão correspondente.

1.6.2. **Condições de ensaio**

As substâncias são ensaiadas tal qual são recebidas.

1.6.3. **Realização do ensaio**

Enche-se o cubo com a substância de ensaio e bate-se suavemente adicionando-se mais substância até o cubo estar completamente cheio. Depois suspende-se o cubo no centro do forno, à temperatura ambiente. Coloca-se um termopar no centro do cubo e coloca-se outro entre o cubo e a parede do forno para registar a temperatura deste.

As temperaturas do forno e da amostra são registadas continuamente ao mesmo tempo que a temperatura do forno aumenta até 400ºC ou até ao ponto de fusão da substância, se for inferior, à razão de 0,5ºC/minuto.

Ao ocorrer a ignição da substância o termopar da amostra indicará uma subida muito rápida da temperatura, superior à temperatura do forno.

2. **RESULTADOS**

A temperatura do forno à qual a temperatura da amostra atinge 400ºC por auto-aquecimento é relevante para a avaliação (ver figura 2).

3. **RELATÓRIO**

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

— uma descrição da substância a ensaiar,

— os resultados da medição, incluindo a curva temperatura/tempo,

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

4. **REFERÊNCIAS**

(1) NF T 20-036 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

▼B

Figura 1

Planificação do cubo de ensaio com 20 mm de aresta

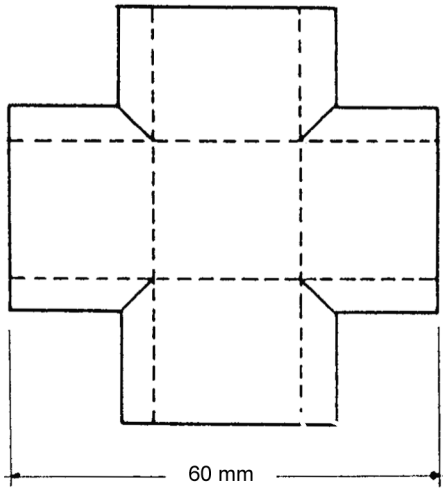
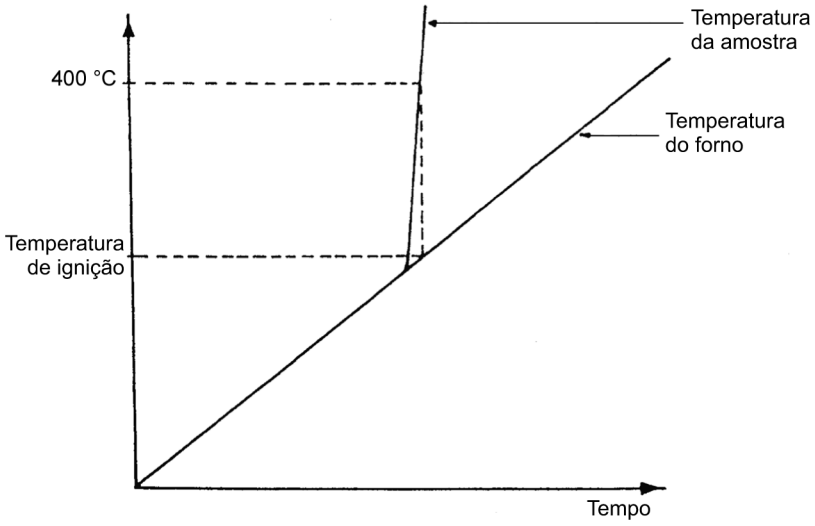


Figura 2

Curva típica de temperatura/tempo



▼B

A.17. **PROPRIEDADES OXIDANTES (SÓLIDOS)**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

É útil possuir informações preliminares sobre quaisquer potenciais propriedades explosivas da substância antes de se efectuar este ensaio.

Este ensaio não é aplicável a líquidos, gases, substâncias explosivas ou altamente inflamáveis ou peróxidos orgânicos.

Não é necessário efectuar este ensaio no caso de o exame da fórmula estrutural determinar, para além de qualquer dúvida razoável, que a substância é incapaz de reagir exotermicamente com um material combustível.

No sentido de se determinar se o ensaio deve ser efectuado com precauções especiais, dever-se-á efectuar um ensaio preliminar.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

Tempo de combustão: é o tempo de reacção, em segundos, necessário para a zona de reacção se deslocar ao longo de uma pilha utilizando o procedimento descrito em 1.6.

Velocidade de combustão: expressa em milímetros por segundo.

Velocidade máxima de combustão: é o valor máximo das velocidades de combustão obtidas com misturas contendo entre 10 % e 90 % em peso do oxidante.

1.3. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Utiliza-se o nitrato de bário (qualidade analítica) como substância de referência para o ensaio e para o ensaio preliminar.

A mistura de referência é uma mistura de nitrato de bário com pó de celulose preparada de acordo com 1.6., que possui a velocidade máxima de combustão (normalmente é uma mistura contendo nitrato de bário na proporção de 60 % em peso).

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Por razões de segurança, efectua-se um ensaio preliminar. Não é necessário mais nenhum ensaio no caso de se verificar claramente no ensaio preliminar que a substância de ensaio possui propriedades oxidantes. Se não for esse o caso, a substância deverá ser então submetida ao ensaio completo.

No ensaio completo mistura-se, segundo proporções variáveis, a substância que se pretende ensaiar e uma substância combustível previamente definida. Depois forma-se uma pilha com cada mistura e procede-se à ignição dessa pilha numa das suas extremidades. A velocidade máxima de combustão determinada é então comparada com a velocidade máxima de combustão da mistura de referência.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Se necessário, é válido qualquer método de trituração e de mistura desde que a diferença entre as velocidades máximas de combustão em seis ensaios separados não se afastem do valor correspondente à média aritmética em mais do que 10 %.

▼B

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1. **Preparação**

1.6.1.1. *Substância de ensaio*

Reduz-se a amostra de ensaio a partículas com dimensões < 0,125 mm utilizando o procedimento seguinte: peneira-se a substância de ensaio, tritura-se a parte restante e repete-se o procedimento até toda a substância de ensaio passar pelo peneiro.

Pode-se utilizar qualquer método de trituração e de crivagem que satisfaçam os critérios qualitativos.

Antes da preparação da mistura seca-se a substância à temperatura de 105 ºC, até se obter um peso constante. No caso de a temperatura de decomposição da substância de ensaio ser inferior a 105 ºC, torna-se necessário secar a substância a uma temperatura inferior adequada.

1.6.1.2. *Substância combustível*

Utiliza-se pó de celulose como substância combustível. A celulose deverá ser do tipo utilizado para a cromatografia de camada fina ou para a cromatografia em coluna. Verificou-se que é adequada a celulose em que 85 % das fibras possui um comprimento compreendido entre 0,020 e 0,075 mm. Faz-se passar o pó de celulose através de um peneiro de malha de 0,125 mm. Em todo o ensaio deve-se utilizar o mesmo lote de celulose.

Antes de se preparar a mistura efectua-se a secagem do pó de celulose à temperatura de 105 ºC até se obter um peso constante.

No caso de se utilizar serradura no ensaio preliminar faz-se a preparação dessa serradura de madeira macia recolhendo a porção que passa através de um peneiro de malha de 1,6 mm, mistura-se muito bem e depois seca-se à temperatura de 105ºC durante 4 horas numa camada com espessura inferior a 25 mm. Arrefece-se e armazena-se num recipiente estanque ao ar, tão cheio quanto for possível, de preferência ao fim de 24 horas de secagem.

1.6.1.3. *Fonte de ignição*

Como fonte de ignição deve utilizar-se uma chama de um queimador de gás (com diâmetro mínimo de 5mm). No caso de se utilizar outra fonte de ignição (por exemplo, quando se efectua o ensaio em atmosfera inerte), deverá constar do relatório uma descrição e a justificação.

1.6.2. **Realização do ensaio**

Nota:

As misturas de oxidantes com celulose ou com serradura devem ser tratadas como potencialmente explosivas e manuseadas com as devidas precauções.

1.6.2.1. *Ensaio preliminar*

Mistura-se muito bem a substância seca com a celulose ou com a serradura seca na proporção em peso de duas partes da substância de ensaio para uma parte de celulose ou de serradura e com essa mistura prepara-se uma pequena pilha com a configuração de um cone com as dimensões de 3,5 cm (diâmetro da base) × 2,5 cm (altura) enchendo, sem bater, uma forma com a configuração do cone (por exemplo, um funil de vidro de laboratório com o bico tapado).

▼B

Coloca-se essa pilha sobre uma placa fria, não combustível, não porosa e de fraca condutividade térmica. O ensaio deve ser efectuado num aparador com exaustão de fumos tal como em 1.6.2.2.

Coloca-se a fonte de ignição em contacto com o cone. Observa-se e regista-se o vigor e a duração da reacção resultante.

Considera-se que a substância é um oxidante se a reacção for vigorosa.

Em qualquer caso em que o resultado suscite dúvidas é necessário completar depois a sequência de ensaio adiante descrita.

1.6.2.2. *Sequência de ensaio*

Procede-se à preparação de misturas oxidante/celulose contendo oxidante em proporções compreendidas entre 10 % e 90 % em peso, por acrescimentos sucessivos de 10 %. Nos casos limite, deve utilizar-se misturas intermédias de oxidante/celulose para se obter com maior precisão a velocidade máxima de combustão.

A configuração da pilha é conseguida por meio de um molde. Esse molde é feito de metal, tem um comprimento de 250 mm e uma secção recta transversal com uma altura interior de 10 mm e com uma largura interior de 20 mm. De ambos os lados do molde, segundo a direcção longitudinal, faz-se a montagem de duas placas metálicas que constituem limitações laterais que ultrapassam 2 mm a aresta superior da secção recta triangular (ver figura). Enche-se livremente este dispositivo com um ligeiro excesso de mistura. Depois de se deixar cair o molde uma vez, de uma altura de 2 cm sobre uma superfície sólida, remove-se a substância em excesso remanescente com uma folha colocada em posição oblíqua, procede-se à remoção das limitações laterais e alisa-se o pó restante utilizando um cilindro. Depois coloca-se sobre o molde uma placa não combustível, não porosa e de fraca condutibilidade térmica, inverte-se o aparelho e remove-se o molde.

Coloca-se a placa sob o exaustor de um aparador com exaustão de fumos.

A velocidade do ar deverá ser suficiente para evitar que os fumos escapem para o interior do laboratório e não deverá variar durante o ensaio. Em torno do aparelho deverá instalar-se uma blindagem auxiliar da exaustão.

Devido às propriedades higroscópicas da celulose e de algumas substâncias que se pretendem ensaiar o teste deverá ser efectuado tão rapidamente quanto possível.

Inflama-se uma extremidade da pilha por contacto com a chama.

Mede-se o tempo de reacção para uma distância de 200 mm após a zona de reacção se ter propagado, segundo uma distância inicial de 30 mm.

Efectua-se o ensaio com a substância de referência e pelo menos com cada uma das misturas de substância de ensaio com celulose, no intervalo definido.

No caso de se verificar que a velocidade máxima de combustão é significativamente superior à da mistura de referência, pode-se interromper o ensaio; caso contrário, deve-se repetir o ensaio cinco vezes para cada uma das três misturas que proporcionam a velocidade de combustão mais rápida.

▼B

No caso de se suspeitar que o resultado é falsamente positivo, deve-se repetir o ensaio utilizando uma substância inerte com partículas de dimensões idênticas, tal como a diatomite, em vez de celulose. Em alternativa deve-se ensaiar novamente a mistura de substância de ensaio/celulose que possui a velocidade de combustão mais rápida em atmosfera inerte (teor em oxigénio < 2 % v/v).

2. **RESULTADOS**

Por razões de segurança deve-se considerar a velocidade máxima de combustão — em vez do valor médio — como sendo a propriedade oxidante característica da substância de ensaio.

Para a avaliação é relevante o valor máximo da velocidade de combustão obtido numa série de seis ensaios para uma determinada mistura.

Traça-se um gráfico do valor máximo da velocidade de combustão para cada mistura em função da concentração do oxidante. A partir de gráfico conclui-se sobre a velocidade máxima de combustão.

Os seis valores de velocidade de combustão medidos numa experiência efectuada com a mistura de máxima velocidade de combustão não devem diferir do valor da média aritmética em mais do que 10 %; caso contrário, devem aperfeiçoar-se os métodos de trituração e de mistura.

A velocidade máxima de combustão obtida é comparada com a velocidade máxima de combustão da mistura de referência (ver 1.3.).

Se os ensaios forem efectuados em atmosfera inerte, compara-se a velocidade máxima de reacção com a que se obtém com a mistura de referência em atmosfera inerte.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

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

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

— qualquer tratamento da substância de ensaio (por exemplo, trituração, secagem, etc.),

— a fonte de ignição utilizada nos ensaios,

— os resultados das medições,

— o modo de reacção (por exemplo, combustão com chama à superfície, combustão através de toda a massa, qualquer informação relativa aos produtos de combustão, etc.),

— todas as observações adicionais relevantes para a interpretação dos resultados, incluindo uma descrição do vigor (chamas, faíscas, fumos, combustão lenta, etc.) e duração aproximada observados no ensaio preliminar sobre segurança/pesquisa, tanto para a substância de ensaio como para a substância de referência,

— os resultados dos ensaios com uma substância inerte, se existirem,

— os resultados dos ensaios em atmosfera inerte, se existirem.

▼B

3.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Considera-se que uma substância é um oxidante nos casos em que:

a) No ensaio preliminar se observa uma reacção vigorosa;

b) No ensaio completo, a velocidade máxima de combustão das misturas ensaiadas é superior ou igual à velocidade máxima de combustão da mistura de referência constituída por celulose e nitrato de bário.

No sentido de se evitar um resultado positivo falso, os resultados obtidos ao fazer-se o ensaio da substância misturada com um material inerte e/ou ao fazer-se o ensaio sob atmosfera inerte deverão ser considerados também ao fazer-se a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) NF T 20-035 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

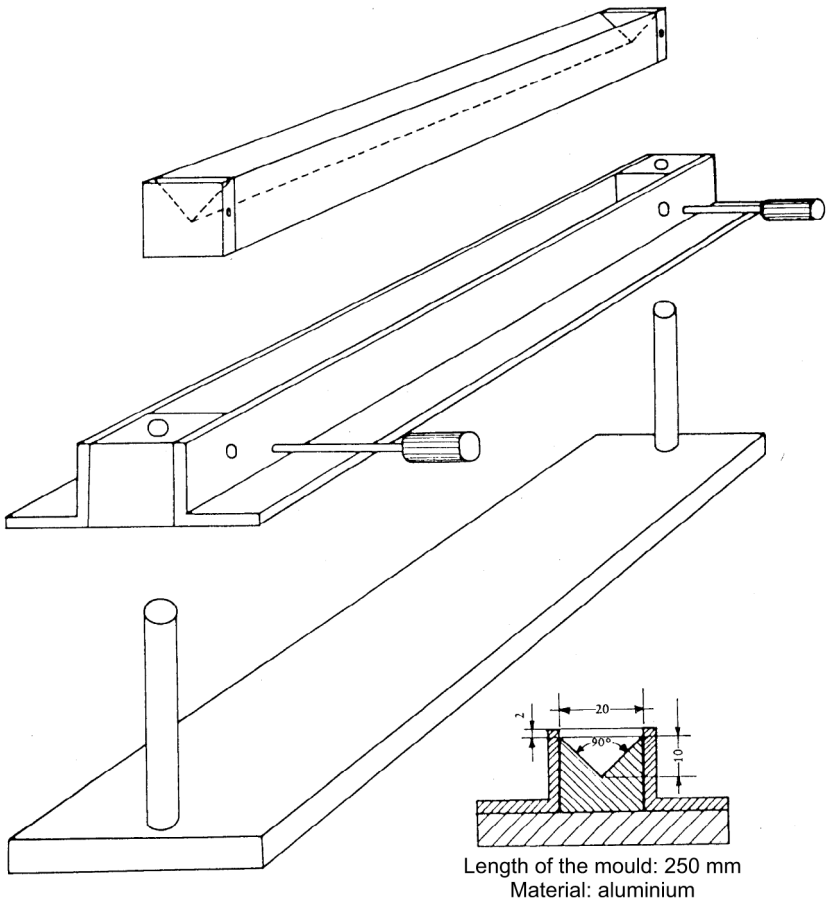
▼B

Apêndice

Figura

Molde e acessórios para a preparação da pilha

(Todas as dimensões estão em milímetros)



▼B

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

1. MÉTODO

O presente método, que utiliza a cromatografia de permeação em gel (GPC), é idêntico ao método OCDE TG 118 (1996). Os respectivos fundamentos e outras informações técnicas são apresentados na referência (1).

1.1. INTRODUÇÃO

Tendo em conta a diversidade das propriedades dos biopolímeros, torna-se impossível descrever um único método que estabeleça de modo preciso as condições de separação e avaliação dos mesmos, abrangendo todas as possibilidades e especificidades. Muitos sistemas poliméricos complexos, nomeadamente, não são analisáveis por cromatografia de permeação em gel. Nos casos em que o recurso a esta técnica não se afigure viável, a massa molecular pode ser determinada através de outros métodos (ver apêndice), devendo documentar-se e justificar-se a opção utilizada.

O método descrito baseia-se na norma DIN 55672 (1); esta última contém informações pormenorizadas sobre o modo de execução do ensaio e a avaliação dos respectivos resultados. Caso seja necessário alterar determinadas condições do processo experimental, deve apresentar-se a devida justificação. Podem utilizar-se outras normas, na condição de apresentar as respectivas referências. O método descrito utiliza, para fins de calibração, amostras de poliestireno de polidispersibilidade conhecida, podendo ser necessário efectuar alterações de modo a torná-lo adequado a determinados polímeros, nomeadamente polímeros hidrossolúveis e polímeros reticulados de cadeia longa.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

A massa molecular média em função do número de moles, M_n, e a massa molecular média relativa à massa das espécies, M_w, são determinadas por recurso às equações:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

em que:

H_i é a intensidade do sinal do detector correspondente ao volume de retenção V_i, contado a partir da linha de base,

M_i é a massa molecular da fracção do polímero correspondente ao volume de retenção V_i e

n é o número de pontos obtidos experimentalmente.

A amplitude da distribuição de massas moleculares, que constitui uma medida da dispersibilidade do sistema, é dada pelo quociente M_w/M_n

▼B

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Uma vez que a cromatografia de permeação em gel constitui um método relativo, deve efectuar-se uma calibração. Para tal, podem utilizar-se padrões de poliestireno de cadeia linear, com uma distribuição limitada, e massas moleculares médias (M_n e M_w) e distribuição de massas moleculares conhecidas. A curva de calibração apenas pode ser utilizada na determinação da massa molecular da amostra desconhecida caso as condições de separação da referida amostra e dos padrões tenham sido seleccionadas de modo idêntico.

Uma determinada relação entre a massa molecular e o volume de eluição apenas é válida nas condições específicas de cada ensaio. Estas últimas incluem, nomeadamente, a temperatura, o tipo de solvente (ou mistura de solventes), as condições cromatográficas e a coluna ou sistema de colunas de separação.

As massas moleculares da amostra determinadas pelo método em causa constituem valores relativos, sendo designadas «massas moleculares em equivalentes de poliestireno». Tal facto significa que as massas moleculares podem apresentar desvios relativamente aos valores absolutos em função das diferenças estruturais e químicas entre a amostra e os padrões. Caso se utilizem outros padrões, nomeadamente polietilenoglicol, óxido de polietileno, metracrilato de polimetilo ou ácido poliacrílico, devem justificar-se os motivos.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A determinação da distribuição das massas moleculares, bem como das massas moleculares médias da amostra (M_n, M_w), pode fazer-se por recurso à cromatografia de permeação em gel, que consiste numa variante da cromatografia líquida em que a amostra é separada em função dos volumes hidrodinâmicos dos diversos componentes (2).

A separação é efectuada por passagem através de uma coluna cujo enchimento consiste num material poroso, de modo geral um gel orgânico. As moléculas de dimensões mais reduzidas passam através dos poros, sendo as restantes excluídas. A fixação das moléculas de maiores dimensões é, pois, menor, sendo eluídas em primeiro lugar. As moléculas de dimensões médias passam através de alguns poros, sendo eluídas numa fase posterior. Finalmente, as moléculas de dimensões mais reduzidas, que possuem um raio hidrodinâmico inferior ao dos poros do gel, penetram estes últimos, sendo eluídas em último lugar.

Em condições ideais, a separação é determinada apenas pelas dimensões das moléculas, embora, na prática, seja difícil evitar algumas interferências devidas à adsorção. A não uniformidade do enchimento e a existência de volumes mortos poderão induzir problemas complementares (2).

A detecção pode ser efectuada com base no índice de refracção ou por absorção no ultravioleta, originando uma curva de distribuição simples. Todavia, de modo a atribuir valores de massa molecular aos vários pontos da curva, é necessário efectuar uma calibração por recurso a polímeros de massa molecular conhecida e, se possível, de estrutura similar, nomeadamente padrões de poliestireno. A curva resultante da representação gráfica da quantidade, em massa, das diversas espécies eluídas em função do logaritmo da massa molecular deve exibir uma distribuição de Gauss, por vezes distorcida por uma ligeira assimetria na região das massas moleculares mais reduzidas.

▼B

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

A repetibilidade (desvio-padrão relativo) do volume de eluição deve ser superior a 0,3 %. Se um cromatograma elaborado em função do tempo não corresponder aos critérios *supra*, deve assegurar-se a necessária repetibilidade da análise mediante correcção por recurso a um padrão interno (1). As polidispersões dependem da massa molecular de cada padrão. No caso da utilização de padrões de poliestireno, os valores característicos são os seguintes:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

em que M_p representa a massa molecular do padrão correspondente ao máximo do pico.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Preparação das soluções-padrão de poliestireno**

Os padrões de poliestireno são dissolvidos, com agitação, no eluente escolhido. Na preparação das soluções devem ter-se em conta as recomendações do fabricante.

As concentrações dos padrões dependem de vários factores, nomeadamente o volume de injecção, a viscosidade da solução e a sensibilidade do detector. Deve adaptar-se o volume de injecção máximo ao comprimento da coluna, de modo a evitar uma sobrecarga. Os volumes de injecção característicos de separações analíticas por cromatografia de permeação em gel com uma coluna de 30 cm × 7,8 mm situam-se, de modo geral, entre 40 e 100 µl. É possível injectar volumes superiores, que não devem, contudo, exceder 250 µl. Antes de calibrar a coluna, deve determinar-se o rácio adequado volume de injecção/concentração.

1.6.2. **Preparação da solução de amostra**

De modo geral, as condições atrás referidas são também aplicáveis à preparação das soluções de amostra. Esta última é dissolvida num solvente adequado, nomeadamente tetra-hidrofurano (THF), sob agitação cuidadosa. Em caso algum deverá utilizar-se um banho de ultra-sons. Se necessário, a solução de amostra pode ser purificada por passagem através de um filtro de membrana, cujos poros deverão ter dimensões compreendidas entre 0,2 e 2 µm.

Deve referir-se no relatório final a eventual presença de partículas não dissolvidas, que poderão conter espécies de massa molecular superior. Deve utilizar-se um método adequado para determinar a percentagem ponderal das partículas em causa. As soluções devem ser utilizadas nas 24 horas subsequentes à sua preparação.

1.6.3. **Equipamento**

— Reservatório de solvente,

— desgaseificador (se adequado),

— bomba,

▼B

— amortecedor de pulsações (se adequado),

— sistema de injecção,

— colunas cromatográficas,

— detector,

— medidor de caudal (se adequado),

— sistema de registo e processamento de dados,

— recipiente para resíduos.

Deve assegurar-se o carácter inerte do sistema cromatográfico em relação aos solventes utilizados (nomeadamente no caso da utilização de capilares de aço com THF).

1.6.4. **Sistema de injecção e de aporte de solvente**

Introduz-se na coluna um determinado volume de solução de amostra, manualmente ou por intermédio de um amostrador automático, numa zona bem definida. No caso da introdução manual, a compressão do êmbolo ou a retirada da seringa demasiado rápidas poderão determinar alterações na distribuição de massas moleculares obtida. O sistema de aporte de solvente deve ser uniforme, recorrendo, se possível, a um amortecedor de pulsações. O caudal deve ser da ordem de 1 ml/min.

1.6.5. **Coluna**

Em função do tipo de amostra, os polímeros são analisados por recurso a uma única coluna ou a diversas colunas ligadas em série. Encontram-se disponíveis nos circuitos comerciais colunas de materiais porosos com propriedades (por exemplo, dimensões dos poros, limites de exclusão) bem definidas. A selecção do gel a utilizar, bem como do comprimento da coluna, depende das propriedades da amostra (volumes hidrodinâmicos, distribuição das massas moleculares) e das condições específicas de separação, nomeadamente o tipo de solvente utilizado, a temperatura e o caudal (l) (2) (3).

1.6.6. **Pratos teóricos**

Deve caracterizar-se a coluna ou sistema de colunas a utilizar na separação pelo respectivo número de pratos teóricos. No caso da utilização de THF como solvente de eluição, introduzir uma solução de etilbenzeno ou outro soluto apolar adequado numa coluna de comprimento conhecido. O número de pratos teóricos é dado pela equação:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \quad \text{ou} \quad N = 16 \left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

em que:

N = representa o número de pratos teóricos,

V_e = representa o volume de eluição correspondente ao máximo do pico,

▼B

W = representa a largura da base do pico,

$W_{1/2}$ = representa a largura do pico a meia altura.

1.6.7. **Eficiência de separação**

Além do número de pratos teóricos, que determina a largura das bandas, a eficiência de separação, obtida a partir do declive da curva de calibração, desempenha também um papel importante. A eficiência de separação de uma coluna é dada por:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{secção transversal da coluna}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

em que:

$V_{e,\ Mx}$ = representa o volume de eluição de uma fracção de poliestireno com massa molecular M_x e

$V_{e,(10Mxx)}$ = representa o volume de eluição de uma fracção de poliestireno com massa molecular dez vezes superior.

A resolução do sistema é geralmente definida do seguinte modo:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

em que:

V_{e1}, V_{e2} = representam os volumes de eluição dos dois padrões de poliestireno, correspondentes ao máximo dos picos,

W_1, W_2 = representam a largura da base dos picos, e

M_1, M_2 = representam as massas moleculares correspondentes aos máximos dos picos, devendo diferir num factor de 10.

O valor R do sistema de colunas deve ser superior a 1,7 (4).

1.6.8. **Solventes**

Todos os solventes devem possuir um elevado grau de pureza (no caso do THF, o grau de pureza deve ser de 99,5 %). As dimensões do reservatório de solvente (que pode, se necessário, encontrar-se sob atmosfera inerte) devem ser suficientes para permitir a calibração da coluna e a realização de diversas análises. O solvente deve ser desgaseificado antes da sua introdução na coluna por intermédio da bomba.

1.6.9. **Controlo da temperatura**

A temperatura dos componentes críticos internos (septo de injecção, colunas, detector, tubagens) deve ser constante e adequada ao solvente escolhido.

▼B

1.6.10. **Detector**

A função do detector consiste no registo quantitativo da concentração da amostra eluída da coluna. De modo a evitar o alargamento dos picos, o volume da célula de detecção deve ser tão reduzido quanto possível, não devendo exceder 10 μl, excepto no caso dos detectores de difusão de radiações e de viscosidade. O método de detecção mais corrente consiste na refractometria diferencial. Todavia, se as propriedades específicas da amostra ou do solvente de eluição o justificarem, podem utilizar-se outros tipos de detectores, nomeadamente de radiação ultravioleta/visível, infravermelha e detectores de viscosidade.

2. **RESULTADOS E SUA APRESENTAÇÃO**

2.1. RESULTADOS

Para pormenores sobre os critérios de avaliação, bem como no que respeita às exigências em matéria de recolha e processamento de dados, deve consultar-se a norma DIN relevante (1).

Devem efectuar-se duas análises independentes e individuais de cada amostra.

Em cada análise, devem determinar-se os parâmetros M_n, M_w, M_w/M_n e M_p. Deve indicar-se explicitamente que os valores determinados constituem valores relativos equivalentes à massa molecular do padrão utilizado.

Após a determinação dos volumes de retenção ou tempos de retenção (eventualmente corrigidos por recurso a um padrão interno), representa-se graficamente o logaritmo de M_p (valor correspondente ao máximo do pico relativo ao padrão de calibração) em função de um dos parâmetros referidos. São necessários pelo menos dois pontos de calibração por década de massas moleculares e pelo menos cinco pontos para a curva total, que deve abranger a massa molecular estimada da amostra. A extremidade da curva de calibração correspondente às massas moleculares mais reduzidas é definida pelo n-hexilbenzeno ou outro solvente apolar adequado. As massas moleculares relativas ao número de moles e à massa das espécies são, em geral, obtidas por processamento electrónico dos dados, com base nas fórmulas que se apresentam no ponto 1.2. Caso se recorra ao tratamento manual dos mesmos, pode consultar-se a norma ASTM D 3536-91 (3).

Deve apresentar-se a distribuição na forma de quadro ou de gráfico (percentagem da soma ou do diferencial da frequência em função de log M). Na representação gráfica, uma década de massas moleculares deve corresponder a cerca de 4 cm, devendo a altura máxima dos picos ser de cerca de 8 cm. No caso de curvas de distribuição integral, a diferença entre 0 e 100 % deve corresponder a cerca de 10 cm.

2.2. RELATÓRIO

O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

2.2.1. **Substância em estudo**

— Dados disponíveis sobre a substância em estudo (identidade, aditivos, impurezas),

▼B

— descrição do tratamento da amostra, observações, problemas surgidos.

2.2.2. **Equipamento**

— Reservatório de eluente, gás inerte, desgaseificação do eluente, composição do eluente, impurezas,

— bomba, amortecedor de pulsações, sistema de injecção,

— colunas de separação (fabricante, todas as informações disponíveis sobre as características das colunas, nomeadamente dimensões dos poros, tipo de material utilizado, número, comprimento e ordem de utilização das colunas),

— número de pratos teóricos da coluna ou sistema de colunas; eficiência de separação (resolução do sistema),

— informações relativas à simetria dos picos,

— temperatura da coluna, tipo de controlo da temperatura utilizado,

— detector (princípio utilizado, tipo, volume da célula),

— medidor de caudal, se utilizado (fabricante, princípio utilizado),

— sistema de registo e processamento dos dados (equipamento e suporte lógico).

2.2.3. **Calibração do sistema**

— Descrição pormenorizada do método utilizado para obter a curva de calibração,

— informações relativas aos critérios de qualidade aplicáveis ao método (por exemplo, coeficiente de correlação, erro quadrático médio, etc.),

— informações relativas às extrapolações, hipóteses e aproximações efectuadas no decurso do processo experimental, bem como da avaliação e processamento dos dados,

— devem apresentar-se na forma de quadro os dados utilizados para a obtenção da curva de calibração, incluindo, para cada ponto de calibração, as seguintes informações:

  — nome da amostra,

  — fabricante da amostra,

  — valores de M_p, M_n, M_w, M_w/M_n característicos dos padrões, fornecidos pelo fabricante ou obtidos em determinações posteriores, bem como pormenores sobre o método de determinação utilizado,

  — volume de injecção e concentração da substância injectada,

▼B

— valor de M_p utilizado para a calibração,

— volume de eluição ou tempo de retenção corrigido correspondentes ao máximo dos picos,

— valores de M_p correspondentes ao máximo dos picos,

— percentagem de erro dos valores de M_p calculados e do valor de calibração.

2.2.4. **Avaliação**

— Avaliação com base no tempo: métodos utilizados para assegurar a reprodutibilidade requerida (método de correcção, padrão interno, etc.),

— informações que indiquem se a avaliação foi efectuada com base no volume de eluição ou no tempo de retenção,

— informações sobre os limites de avaliação, caso um pico não seja totalmente analisado,

— descrição dos eventuais métodos de nivelamento de dados utilizados,

— processos de preparação e tratamento prévio da amostra,

— eventual presença de partículas não dissolvidas,

— volume de injecção (expresso em µl) e concentração de injecção (expressa em mg/ml),

— observações que indiquem efeitos susceptíveis de induzir desvios relativamente às condições cromatográficas ideais,

— descrição pormenorizada das alterações aos procedimentos de ensaio,

— pormenores relativos às margens de erro,

— quaisquer outras informações e observações que possuam importância para a interpretação dos resultados.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91 (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography--GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92 (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Apêndice

Exemplos de outros métodos de determinação da massa molecular média em função do número de moles (M_n) em polímeros

A cromatografia de permeação em gel constitui o método mais indicado para a determinação de M_n, em especial sempre que se encontre disponível uma série de padrões com estrutura idêntica à do polímero a analisar. Todavia, nos casos em que o recurso àquela técnica apresente dificuldades práticas ou em que se preveja que a substância em causa não satisfaz um critério regulamentar em matéria de M_n, sendo necessário confirmar tal facto podem aplicar-se métodos alternativos, nomeadamente:

1. **Utilização das propriedades coligativas**

1.1. *Ebulioscopia/crioscopia*:

estas técnicas baseiam-se, respectivamente, na determinação do aumento do ponto de ebulição e do abaixamento do ponto de congelação de um solvente induzidos pela adição do polímero. O princípio do método consiste no facto de os efeitos do polímero dissolvido no ponto de ebulição ou de congelação do solvente dependerem da massa molecular do polímero (1) (2).

Aplicabilidade: $M_n < 20\,000$

1.2. *Abaixamento da pressão de vapor*:

esta técnica baseia-se na medição da pressão de vapor de um líquido de referência antes e após a adição de determinadas quantidades do polímero (1) (2).

Aplicabilidade: $M_n < 20\,000$ (em teoria; na prática, o valor é limitado).

1.3. Osmometria de membrana:

esta técnica baseia-se no princípio da osmose, isto é, da tendência natural das moléculas de solvente de passarem, através de uma membrana semipermeável, de uma solução diluída para uma solução concentrada, até atingir o equilíbrio. No ensaio em causa, a concentração da solução diluída é nula, enquanto que a solução concentrada contém o polímero. A passagem do solvente através da membrana determina uma diferença de pressão dependente da concentração e da massa molecular do polímero (1) (3) (4).

Aplicabilidade: valores de M_n compreendidos entre 20 000 e 200 000.

1.4. *Osmometria de fase de vapor*:

esta técnica baseia-se na comparação da velocidade de evaporação de um aerossol de solvente puro com a velocidade de evaporação de, no mínimo, três aerossóis que contêm o polímero em concentrações diversas (1) (5) (6).

Aplicabilidade: $M_n < 20\,000$

▼B

2. **Análise dos grupos terminais**

A utilização deste método implica o conhecimento simultâneo da estrutura global do polímero e da natureza dos grupos terminais, distinguíveis da cadeia principal por recurso a técnicas tais como a ressonância magnética nuclear, a titulação ou a formação de derivados. Com base na determinação da concentração molecular dos grupos terminais presentes no polímero, pode obter-se a respectiva massa molecular (7) (8) (9).

Aplicabilidade: M_n não superior a 50 000 (com fiabilidade decrescente).

3. **Referências**

(1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymeer Science, 3rd ed., John Wiley, New York.

(2) Glover, CA., (1975), Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E., Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989), Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper e., J. Wiley and Sons, p. 25--52.

(5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

(7) Schröder, E. Muller, G., and Arndt, K-F, (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3. In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S., *et al.* (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

A.19. TEOR EM POLÍMEROS DE BAIXA MASSA MOLECULAR

1. MÉTODO

O presente método, que utiliza a cromatografia de permeação em gel, é idêntico ao método OCDE TG 119 (1996). Os respectivos fundamentos e outras informações técnicas são apresentados nas referências.

1.1. INTRODUÇÃO

Tendo em conta a diversidade das propriedades dos biopolímeros, torna-se impossível descrever um único método que estabeleça de modo preciso as condições de separação e avaliação dos mesmos, abrangendo todas as possibilidades e especificidades. Muitos sistemas poliméricos complexos, nomeadamente, não são analisáveis por cromatografia de permeação em gel (GPC). Nos casos em que o recurso a esta técnica não se afigure viável, a massa molecular pode ser determinada através de outros métodos (ver apêndice), devendo documentar-se e justificar-se a opção utilizada.

O método descrito baseia-se na norma DIN 55672 (1); esta última contém informações pormenorizadas sobre o modo de execução do ensaio e a avaliação dos respectivos resultados. Caso seja necessário alterar determinadas condições do processo experimental, deve apresentar-se a devida justificação. Podem utilizar-se outras normas, na condição de apresentar as respectivas referências. O método descrito utiliza, para fins de calibração, amostras de poliestireno de polidispersibilidade conhecida, podendo ser necessário efectuar alterações de modo a torná-lo adequado a determinados polímeros, nomeadamente polímeros hidrossolúveis e polímeros reticulados de cadeia longa.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

Por convenção, considera-se baixa uma massa molecular inferior a 1 000 dalton.

A massa molecular média em função do número de moles, M_n, e a massa molecular média relativa à massa das espécies, M_w, são determinadas por recurso às equações:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

em que:

H_i = é a intensidade do sinal do detector correspondente ao volume de retenção V_j, contado a partir da linha de base,

M_i = é a massa molecular da fracção do polímero correspondente ao volume de retenção V_i, e n é o número de pontos obtidos experimentalmente.

A amplitude da distribuição de massas moleculares, que constitui uma medida da dispersibilidade do sistema, é dada pelo quociente M_w/M_n.

▼B

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Uma vez que a cromatografia de permeação em gel constitui um método relativo deve efectuar-se uma calibração. Para tal, podem utilizar-se padrões de poliestireno de cadeia linear, com uma distribuição limitada, e massas moleculares médias (M_n e M_w) e distribuição de massas moleculares conhecidas. A curva de calibração apenas pode ser utilizada na determinação da massa molecular da amostra desconhecida caso as condições de separação da referida amostra e dos padrões tenham sido seleccionadas de modo idêntico.

Uma determinada relação entre a massa molecular e o volume de eluição apenas é válida nas condições específicas de cada ensaio. Estas últimas incluem, nomeadamente, a temperatura, o tipo de solvente (ou mistura de solventes), as condições cromatográficas e a coluna ou sistema de colunas de separação.

As massas moleculares da amostra determinadas pelo método em causa constituem valores relativos, sendo designadas «massas moleculares em equivalentes de poliestireno». Tal facto significa que as massas moleculares podem apresentar desvios relativamente aos valores absolutos em função das diferenças estruturais e químicas entre a amostra e os padrões. Caso se utilizem outros padrões, nomeadamente polietilenoglicol, óxido de polietileno, metracrilato de polimetilo ou ácido poliacrílico, devem justificar-se os motivos.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A determinação da distribuição das massas moleculares, bem como das massas moleculares médias da amostra (M_n M_w), pode fazer-se por recurso à cromatografia de permeação em gel, que consiste numa variante da cromatografia líquida em que a amostra é separada em função dos volumes hidrodinâmicos dos diversos componentes (2).

A separação é efectuada por passagem através de uma coluna cujo enchimento consiste num material poroso, de modo geral um gel orgânico. As moléculas de dimensões mais reduzidas passam através dos poros, sendo as restantes excluídas. A fixação das moléculas de maiores dimensões é, pois, menor, sendo eluídas em primeiro lugar. As moléculas de dimensões médias passam através de alguns poros, sendo eluídas numa fase posterior. Finalmente, as moléculas de dimensões mais reduzidas, que possuem um raio hidrodinâmico inferior ao dos poros do gel, penetram estes últimos, sendo eluídas em último lugar.

Em condições ideais, a separação é determinada apenas pelas dimensões das moléculas, embora, na prática, seja difícil evitar algumas interferências devidas à absorção. A não uniformidade do enchimento e a existência de volumes mortos poderão induzir problemas complementares (2).

A detecção pode ser efectuada com base no índice de refracção ou por absorção no ultravioleta, originando uma curva de distribuição simples. Todavia, de modo a atribuir valores de massa molecular aos vários pontos da curva, é necessário efectuar uma calibração por recurso a polímeros de massa molecular conhecida e, se possível, de estrutura similar, nomeadamente padrões de poliestireno. A curva resultante da representação gráfica da quantidade, expressa em massa, das diversas espécies eluídas em função do logaritmo da massa molecular deve exibir uma distribuição de Gauss, por vezes distorcida por uma ligeira assimetria na região das massas moleculares mais reduzidas.

▼B

O teor de espécies de baixa massa molecular é determinado a partir da curva. O respectivo cálculo preciso depende da reprodução do comportamento do polímero por parte das referidas espécies, por unidade de massa.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

A repetibilidade (desvio-padrão relativo) do volume de eluição deve ser superior a 0,3 %. Se um cromatograma elaborado em função do tempo não corresponder aos critérios *supra* deve assegurar-se a necessária repetibilidade da análise mediante correcção por recurso a um padrão interno (1). As polidispersões dependem da massa molecular de cada padrão. No caso da utilização de padrões de poliestireno, os valores característicos são os seguintes:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p representa a massa molecular do padrão correspondente ao máximo do pico).

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Preparação das soluções-padrão de poliestireno**

Os padrões de poliestireno são dissolvidos, com agitação, no eluente escolhido, tendo em conta as recomendações do fabricante.

As concentrações dos padrões dependem de vários factores, nomeadamente o volume de injecção, a viscosidade da solução e a sensibilidade do detector. Deve adaptar-se o volume de injecção máximo ao comprimento da coluna, de modo a evitar uma sobrecarga. Os volumes de injecção característicos de separações analíticas por cromatografia de permeação em gel com uma coluna de 30 cm × 7,8 mm situam-se, de modo geral, entre 40 e 100 µl. É possível injectar volumes superiores, que não devem, contudo, exceder 250 µl. Antes de calibrar a coluna, deve determinar-se o rácio adequado volume de injecção/concentração.

1.6.2. **Preparação da solução de amostra**

De modo geral, as condições atrás referidas são também aplicáveis à preparação das soluções de amostra. Esta última é dissolvida num solvente adequado, nomeadamente tetra-hidrofurano (THF), sob agitação cuidadosa. Em caso algum deverá utilizar-se um banho de ultra-sons. Se necessário, a solução de amostra pode ser purificada por passagem através de um filtro de membrana, cujos poros deverão ter dimensões compreendidas entre 0,2 e 2 µm.

Deve referir-se no relatório final a eventual presença de partículas não dissolvidas, que poderão conter espécies de massa molecular superior. Deve utilizar-se um método adequado para determinar a percentagem ponderal das partículas em causa. As soluções devem ser utilizadas nas 24 horas subsequentes à sua preparação.

▼B

1.6.3. **Correcções determinadas pela presença de impurezas e aditivos**

No que respeita ao teor de espécies com M < 1 000, torna-se geralmente necessário introduzir uma correcção destinada a ter em conta a presença de componentes específicos não poliméricos (nomeadamente impurezas e aditivos), excepto no caso de o teor determinado ser inferior a 1 %. A referida correcção pode ser efectuada por análise directa da solução de polímero ou da solução obtida após a eluição cromatográfica.

Se a solução obtida por eluição cromatográfica for demasiado diluída para permitir a análise, deverá ser concentrada, podendo ser necessário evaporá-la à secura, redissolvendo o resíduo. A concentração deve ser efectuada em condições que assegurem a não concorrência de alterações na solução eluída. O tratamento desta depende do método analítico utilizado para a análise quantitativa.

1.6.4. **Equipamento**

O equipamento de cromatografia de permeação em gel inclui os seguintes componentes:

— reservatório de solvente,

— desgaseificador (se adequado),

— bomba,

— amortecedor de pulsações (se adequado),

— sistema de injecção,

— colunas cromatográficas,

— detector,

— medidor de caudal (se adequado),

— sistema de registo e processamento de dados,

— recipiente para resíduos.

Deve assegurar-se o carácter inerte do sistema cromatográfico em relação aos solventes utilizados (nomeadamente no caso da utilização de capilares de aço com THF).

1.6.5. **Sistema de injecção e de aporte de solvente**

Introduz-se na coluna um determinado volume de solução de amostra, manualmente ou por intermédio de um amostrador automático, numa zona bem definida. No caso da introdução manual, a compressão do êmbolo ou a retirada da seringa demasiado rápidas poderão determinar alterações na distribuição de massas moleculares obtida. O sistema de aporte de solvente deve ser uniforme, recorrendo, se possível, a um amortecedor de pulsações. O caudal deve ser da ordem de 1 ml/min.

1.6.6. **Coluna**

Em função do tipo de amostra, os polímeros são analisados por recurso a uma única coluna ou a diversas colunas ligadas em série. Encontram-se disponíveis nos circuitos comerciais colunas de materiais porosos com propriedades (por exemplo, dimensões dos poros, limites de exclusão) bem definidas. A selecção do gel a utilizar, bem como do comprimento da coluna, depende das propriedades da amostra (volumes hidrodinâmicos, distribuição das massas moleculares) e das condições específicas de separação, nomeadamente o tipo de solvente utilizado, a temperatura e o caudal (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Pratos teóricos**

Deve caracterizar-se a coluna ou sistema de colunas a utilizar na separação pelo respectivo número de pratos teóricos. No caso da utilização de THF como solvente de eluição, introduzir uma solução de etilbenzeno ou outro soluto apolar adequado numa coluna de comprimento conhecido. O número de pratos teóricos é dado pela equação:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{ou} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

em que:

N = representa o número de pratos teóricos,

V_e = representa o volume de eluição correspondente ao máximo do pico,

W = representa a largura da base do pico,

$W_{1/2}$ = representa a largura do pico a meia altura.

1.6.8. **Eficiência de separação**

Além do número de pratos teóricos, que determina a largura das bandas, a eficiência de separação, obtida a partir do declive da curva de calibração, desempenha também um papel importante. A eficiência de separação de uma coluna é dada por:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{secção transversal da coluna}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2} \right]$$

em que

$V_{e,\,Mx}$ = representa o volume de eluição de uma fracção de poliestireno com massa molecular M_x e

$V_{e,(10Mx)}$ = representa o volume de eluição de uma fracção de poliestireno com massa molecular dez vezes superior.

A resolução do sistema é geralmente definida do seguinte modo:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

em que

V_{e1}, V_{e2} = representam os volumes de eluição dos dois padrões de poliestireno, correspondentes ao máximo dos picos,

W_1, W_2 = representam a largura da base dos picos, e

M_1, M_2 = representam as massas moleculares correspondentes aos máximos dos picos, devendo diferir num factor de 10.

O valor R do sistema de colunas deve ser superior a 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Solventes**

Todos os solventes devem possuir um elevado grau de pureza (no caso do THF, o grau de pureza deve ser de 99,5 %). As dimensões do reservatório de solvente (que pode, se necessário, encontrar-se sob atmosfera inerte) devem ser suficientes para permitir a calibração da coluna e a realização de diversas análises. O solvente deve ser desgaseificado antes da sua introdução na coluna por intermédio da bomba.

1.6.10. **Controlo da temperatura**

A temperatura dos componentes críticos internos (septo de injecção, colunas, detector e tubagens) deve ser constante e adequada ao solvente escolhido.

1.6.11. **Detector**

A função do detector consiste no registo quantitativo da concentração da amostra eluída da coluna. De modo a evitar o alargamento dos picos, o volume da célula de detecção deve ser tão reduzido quanto possível, não devendo exceder 10 μl, excepto no caso dos detectores de difusão de radiações e de viscosidade. O método de detecção mais corrente consiste na refractometria diferencial. Todavia, se as propriedades específicas da amostra ou do solvente de eluição o justificarem, podem utilizar-se outros tipos de detectores, nomeadamente de radiação ultravioleta/visível, infravermelha e detectores de viscosidade.

2. **RESULTADOS E SUA APRESENTAÇÃO**

2.1. RESULTADOS

Para pormenores sobre os critérios de avaliação, bem como no que respeita às exigências em matéria de recolha e processamento de dados, deve consultar-se a norma DIN relevante (1).

Devem efectuar-se duas análises independentes e individuais de cada amostra. Em todos os casos, devem efectuar-se também ensaios em branco, em condições idênticas.

Deve indicar-se explicitamente que os valores determinados constituem valores relativos expressos em equivalentes da massa molecular do padrão utilizado.

Após a determinação dos volumes de retenção ou tempos de retenção (eventualmente corrigidos por recurso a um padrão interno), representa-se graficamente o logaritmo de M_p (valor correspondente ao máximo do pico relativo ao padrão de calibração) em função de um dos parâmetros referidos. São necessários pelo menos dois pontos de calibração por década de massas moleculares e pelo menos cinco pontos para a curva total, que deve abranger a massa molecular estimada da amostra. A extremidade da curva de calibração correspondente às massas moleculares mais reduzidas é definida pelo n-hexilbenzeno ou outro solvente apoiar adequado. A parte da curva correspondente a massas moleculares inferiores a 1 000 determina-se e se necessário corrige-se para aditivos e impurezas. Caso se recorra ao tratamento manual dos mesmos, pode consultar-se a norma ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Caso fique retido na coluna um polímero insolúvel, é provável que a sua massa molecular seja superior à massa molecular da fracção solúvel, pelo que a não tomada em conta do mesmo no cálculo do teor de espécies de baixa massa molecular determinará uma sobrestimativa deste último. Apresentam-se em apêndice directrizes para a correcção do teor de espécies de baixa massa molecular de polímeros insolúveis.

Deve apresentar-se a distribuição na forma de quadro ou de gráfico (percentagem da soma ou do diferencial da frequência em função de log M). Na representação gráfica, uma década de massas moleculares deve corresponder a cerca de 4 cm, devendo a altura máxima dos picos ser de cerca de 8 cm. No caso de curvas de distribuição integral, a diferença entre 0 e 100 % deve corresponder a cerca de 10 cm.

2.2. RELATÓRIO

O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

2.2.1. **Substância em estudo**

— Dados disponíveis sobre a substância em estudo (identidade, aditivos, impurezas),

— descrição do tratamento da amostra, observações, problemas.

2.2.2. **Equipamento**

— Reservatório de eluente, gás inerte, desgaseificação do eluente, composição do eluente, impurezas,

— bomba, amortecedor de pulsações, sistema de injecção,

— colunas de separação (fabricante, todas as informações disponíveis sobre as características das colunas, nomeadamente dimensões dos poros, tipo de material utilizado, número, comprimento e ordem de utilização das colunas),

— número de pratos teóricos da coluna ou sistema de colunas; eficiência de separação (resolução do sistema),

— informações relativas à simetria dos picos,

— temperatura da coluna, tipo de controlo da temperatura utilizado,

— detector (princípio utilizado, tipo, volume da célula),

— medidor de caudal, se utilizado (fabricante, princípio utilizado),

— sistema de registo e processamento dos dados (equipamento e suporte lógico).

2.2.3. **Calibração do sistema**

— Descrição pormenorizada do método utilizado para obter a curva de calibração,

▼B

— informações relativas aos critérios de qualidade aplicáveis ao método (por exemplo, coeficiente de correlação, erro quadrático médio, etc.),

— informações relativas às extrapolações, hipóteses e aproximações efectuadas no decurso do processo experimental, bem como da avaliação e processamento dos dados,

— devem apresentar-se na forma de quadro os dados utilizados para a obtenção da curva de calibração, incluindo, para cada ponto de calibração, as seguintes informações:

  — nome da amostra,

  — fabricante da amostra,

  — valores de M_p, M_n, M_w, M_w/M_n característicos dos padrões, fornecidos pelo fabricante ou obtidos em determinações posteriores, bem como pormenores sobre o método de determinação utilizado,

  — volume de injecção e concentração da substância injectada,

  — valor de M_p utilizado para a calibração,

  — volume de eluição ou tempo de retenção corrigido correspondentes ao máximo dos picos,

  — valores de M_p correspondentes ao máximo dos picos,

  — percentagem de erro dos valores de M_p calculados e do valor de calibração.

2.2.4. **Informações sobre o teor em polímeros de baixa massa molecular**

— Descrição dos métodos de análise e dos procedimentos utilizados,

— informações relativas ao teor de espécies e baixa massa molecular da amostra, expresso em percentagem ponderal,

— informações relativas ao teor de impurezas, aditivos e de outras espécies não poliméricas da amostra, expresso em percentagem ponderal.

2.2.5. **Avaliação**

— Avaliação com base no tempo: métodos utilizados para assegurar a reprodutibilidade requerida (método de correcção, padrão interno, etc.),

— informações que indiquem se a avaliação foi efectuada com base no volume de eluição ou no tempo de retenção,

— informações sobre os limites de avaliação, caso um pico não seja totalmente analisado,

— descrição dos eventuais métodos de nivelamento de dados utilizados,

— processos de preparação e tratamento prévio da amostra,

— eventual presença de partículas não dissolvidas,

▼B

— volume de injecção (expresso em μl) e concentração de injecção (expressa em mg/ml),

— observações que indiquem efeitos susceptíveis de induzir desvios relativamente às condições cromatográficas ideais,

— descrição pormenorizada das alterações aos procedimentos de ensaio,

— pormenores relativos às margens de erro,

— quaisquer outras informações e observações que possuam importância para a interpretação dos resultados.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) DIN 55672 (1995). Geldpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J.Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91 (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography--GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92 (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Apêndice

Directrizes para a correcção do teor de espécies de baixa massa molecular determinada pela presença de polímeros insolúveis

A presença de polímeros insolúveis na amostra determina perdas de massa no decurso da análise por cromatografia de permeação em gel. Os polímeros insolúveis são retidos de forma irreversível na coluna ou filtro, enquanto que a porção solúvel da amostra prossegue o seu percurso. Se for possível estimar ou determinar o incremento do índice de refracção do polímero (dn/dc), pode calcular-se a perda de massa na coluna. Neste caso, efectua-se uma correcção por recurso a calibração externa do refractómetro com substâncias-padrão de concentração e dn/dc conhecidos. No exemplo que se segue, utiliza-se um padrão de poli(metacrilato de metilo) (pMMA).

No caso dos polímeros acrílicos, a calibração externa consiste na análise por cromatografia de permeação em gel de uma solução de um padrão de pMMA em tetra-hidrofurano, de concentração conhecida; os dados resultantes são utilizados para calcular a constante do refractómetro, por recurso à fórmula:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

em que:

K = representa a constante do refractómetro, expressa em mV.s/ml,

R = representa a resposta do padrão de pMMA, expressa em mV.s,

C = representa a concentração do padrão de pMMA, expressa em mg/ml,

V = representa o volume de injecção, expresso em ml,

dn/dc = representa o incremento do índice de refracção relativo à solução de pMMA em tetra-hidrofurano, expresso em ml/mg.

Os valores *infra* são característicos de um padrão de pMMA:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

O valor de K resultante ($3{,}05 \times 10^{11}$) é utilizado para o cálculo da resposta teórica do detector no caso da eluição e detecção da totalidade do polímero injectado.

▼B

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

1. MÉTODO

O presente método é idêntico à versão revista do método OCDE TG 120 (1997). As informações técnicas específicas são apresentadas na referência (1).

1.1. INTRODUÇÃO

No caso de determinados polímeros, nomeadamente polímeros de emulsão, pode ser necessário efectuar trabalhos preliminares antes da aplicação do método descrito *infra*. O método não é aplicável a polímeros líquidos e polímeros que reajam com a água nas condições de ensaio.

Nos casos em que a aplicação do método não se afigure viável, pode investigar-se o comportamento dos polímeros na dissolução/-extracção aquosa por recurso a outros métodos, devendo apresentar-se a justificação de tal facto, bem como a descrição pormenorizada dos métodos em causa.

1.2. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Não aplicável.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O comportamento dos polímeros na dissolução/extracção aquosa é determinado através do método do recipiente de vidro (ver A.6 — Solubilidade em água — método do recipiente de vidro) alterado do modo que se descreve de seguida.

1.4. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Não aplicável.

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1. **Equipamento**

O equipamento necessário à aplicação do método é o seguinte:

— dispositivo de trituração (por exemplo, triturador que produza partículas de dimensões conhecidas),

— dispositivo de agitação com possibilidade de controlo da temperatura,

— sistema de filtros de membrana,

— equipamento analítico adequado,

— crivos normalizados.

1.5.2. **Preparação da amostra**

Por recurso a crivos adequados, reduz-se uma amostra representativa a uma granulometria compreendida entre 0,125 e 0,25 mm. De modo a assegurar a estabilidade da amostra ou do processo de trituração, pode ser necessário utilizar um sistema de refrigeração. Os materiais com consistência idêntica à da borracha podem ser triturados à temperatura do azoto líquido (1).

Caso não se obtenham partículas com a granulometria desejada, deve procurar reduzir-se tanto quanto possível as dimensões das mesmas, referindo tal facto no relatório. Este último deve também indicar o modo de armazenagem da amostra triturada, antes da sua utilização no ensaio.

▼B

1.5.3. **Procedimento**

Pesam-se três porções de 10 g da substância em estudo, que se colocam em três recipientes munidos de rolhas de vidro, a cada um dos quais se adicionam 1 000 ml de água. Caso a utilização de 10 g de amostra se revele impraticável, deve utilizar-se a quantidade máxima possível, ajustando o volume de água proporcionalmente à mesma.

Os recipientes são hermeticamente fechados e agitados a 20 ºC. Deve utilizar-se um dispositivo de agitação ou dissolução que funcione a temperatura constante. Após 24 horas, centrifuga-se ou filtra-se o conteúdo de cada recipiente, determinando-se a concentração do polímero na fase aquosa límpida por recurso a um método analítico adequado. Caso não se encontrem disponíveis métodos analíticos adequados aplicáveis à fase aquosa, pode estimar-se a solubilidade ou extractividade totais com base na massa a seco do resíduo de filtração ou do precipitado obtido por centrifugação.

Em geral, é necessário efectuar uma distinção quantitativa entre as impurezas e os aditivos, por um lado, e as espécies de baixa massa molecular, por outro. No caso da determinação gravimétrica, deve também efectuar-se um ensaio em branco, de modo a avaliar a contribuição de eventuais resíduos decorrentes do processo experimental.

O comportamento dos polímeros na dissolução/extracção aquosa a 37 ºC, a pH 2 e pH 9 determina-se como descrito para a experiência a 20 ºC. O pH das soluções é corrigido através da adição quer de tampões quer de ácidos ou bases adequados, nomeadamente ácido clorídrico, ácido acético, hodróxido de sódio ou de potássio de qualidade analítica e amónia.

Em função do método analítico utilizado, devem efectuar-se um ou dois ensaios. Sempre que seja possível utilizar métodos suficientemente específicos que permitam a determinação directa do componente polimérico na fase aquosa, pode efectuar-se um único ensaio, tal como descrito *supra*. Todavia, caso tal não seja possível e seja necessário determinar o comportamento dos polímeros na dissolução/extracção aquosa do polímero por um processo indirecto, nomeadamente através da determinação do teor de carbono orgânico total do extracto aquoso, deve efectuar-se um ensaio complementar em triplicado, utilizando amostras de polímeros dez vezes inferiores e volumes de água idênticos aos utilizados no primeiro ensaio.

1.5.4. **Análise**

1.5.4.1. *Ensaio efectuado com uma única granulometria*

Alguns métodos permitem a análise directa dos componentes poliméricos na fase aquosa. Todavia, como alternativa, pode proceder-se à análise indirecta dos componentes poliméricos dissolvidos/-extraídos mediante a determinação do teor total de componentes solúveis, aplicando uma correcção destinada a ter em conta a presença de componentes específicos não poliméricos.

A determinação das espécies poliméricas totais na fase aquosa pode ser efectuada por recurso a um método suficientemente sensível, como por exemplo:

— determinação do carbono orgânico total mediante digestão com persulfato ou dicromato, de modo a obter CO_2, que é seguidamente doseado por espectroscopia de infravermelhos ou análise química,

▼B

— espectrometria de absorção atómica ou, no caso de polímeros que contenham silício ou metais, de plasma indutivo,

— espectroscopia de absorção ou espectrofluorimetria no ultravioleta, no caso de polímeros arílicos,

— cromatografia em fase líquida acoplada com espectrometria de massa, no caso de amostras de baixa massa molecular.

A referida determinação pode também ser efectuada por evaporação à secura, sob vácuo, do extracto aquoso, seguida de análise do resíduo por espectroscopia de infravermelhos, ultravioleta, etc., ou espectrometria de absorção atómica de plasma indutivo.

Caso a análise da fase aquosa não seja viável, esta última deve ser extraída com um solvente orgânico não miscível em água, nomeadamente um hidrocarboneto clorado. Procede-se em seguida à evaporação do solvente e determinação do teor de polímero de acordo com o método descrito *supra.* Na determinação do grau de dissolução/extracção do polímero devem subtrair-se quaisquer componentes do resíduo identificados como impurezas ou aditivos.

Caso se encontrem presentes quantidades relativamente elevadas das referidas matérias, pode ser necessário analisar o resíduo por HPLC ou cromatografia em fase gasosa, com o objectivo de distinguir as impurezas do monómero e das espécies presentes derivadas do mesmo, de modo a determinar o respectivo teor.

Em alguns casos, poderá bastar a evaporação do solvente orgânico à secura e subsequente pesagem do resíduo seco.

1.5.4.2. *Ensaio efectuado com duas granulometrias*

Determina-se o teor de carbono orgânico total dos extractos aquosos.

Efectua-se uma determinação gravimétrica com a porção não dissolvida e não extraída da amostra. Se, após a centrifugação ou filtragem do conteúdo de um determinado recipiente, permanecerem resíduos poliméricos nas respectivas paredes, deve lavar-se o mesmo com o filtrado até que não se observem quaisquer resíduos, procedendo então a uma nova centrifugação e filtragem. Os resíduos que permaneçam no filtro ou no tubo de centrifugação são secos a 40 ºC, sob vácuo, e pesados.

2. RESULTADOS

2.1. ENSAIO EFECTUADO COM UMA ÚNICA GRANULOMETRIA

Devem apresentar-se os resultados relativos a cada recipiente, bem como os valores médios, expressos em unidades de massa por volume de solução (de modo geral, mg/l) ou de massa por massa de amostra de polímero (de modo geral, mg/g). Deve também fornecer-se a perda de massa da amostra, expressa no quociente entre a massa de soluto e a massa inicial da amostra, bem como os desvios-padrão relativos. Devem apresentar-se dados relativos à totalidade da substância (polímero + aditivos essenciais, etc.) e apenas ao polímero (após subtracção do teor de aditivos).

▼B

2.2. ENSAIO EFECTUADO COM DUAS GRANULOMETRIAS

Os teores de carbono orgânico total dos diversos extractos aquosos (ensaios em triplicado), bem como o valor médio relativo a cada ensaio, devem ser expressos em unidades de massa por volume de solução (de modo geral, mgC/l) ou de massa por massa de amostra de polímero (de modo geral, mgC/g).

O facto de não se observarem diferenças entre os resultados relativos aos rácios superior e inferior amostra/água poderá indicar a extracção efectiva de todos os componentes extractáveis. Neste caso, não é geralmente necessário proceder à análise directa.

Devem apresentar-se as massas dos diversos resíduos, expressas em percentagem das massas iniciais das amostras, calculando as médias relativas a cada ensaio. A diferença entre 100 % e as percentagens obtidas representa as percentagens de matérias solúveis e extractáveis nas amostras originais.

3. RELATÓRIO

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

3.1.1. **Substância em estudo**

— Informações disponíveis sobre a substância em estudo (identidade, aditivos, impurezas, teor de espécies de baixa massa molecular).

3.1.2. **Condições experimentais**

— Descrição dos procedimentos utilizados e das condições experimentais,

— descrição dos métodos analíticos e de detecção utilizados.

3.1.3. **Resultados**

— Solubilidade ou extractividade, expressas em mg/ml; valores individuais e médios obtidos nos ensaios de extracção das diversas soluções, discriminando o teor de polímero e de impurezas, aditivos, etc.,

— solubilidade ou extractividade do polímero, expressas em mg/ml,

— teor de carbono orgânico total dos extractos aquosos, massa do soluto e percentagens calculadas, se for caso disso,

— pH de cada amostra,

— resultados dos ensaios em branco,

— sempre que necessário, referências à instabilidade química da substância em estudo no decurso dos processos de ensaio e analítico,

— quaisquer informações que possuam importância para a interpretação dos resultados.

4. REFERÊNCIAS

(1) DIN 53733 (1976). Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21. **PROPRIEDADES DE COMBURÊNCIA (LÍQUIDOS)**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio destina-se à determinação do potencial de uma substância líquida de aumentar a velocidade ou intensidade de combustão de uma substância combustível, ou de formar misturas homogéneas com uma substância combustível que possam sofrer ignição espontânea. O método baseia-se no ensaio da ONU para líquidos comburentes (1l), ao qual é equivalente. Todavia, uma vez que o método A.21 se destina essencialmente a satisfazer as exigências da Directiva 67/548/CEE, apenas é necessária a comparação com uma substância de referência. Caso se preveja que os resultados do ensaio sejam utilizados para outros fins, pode ser necessário efectuar ensaios complementares e comparações com outras substâncias de referência ([1]).

Não é necessário realizar o ensaio se uma análise simples da fórmula estrutural da substância permitir estabelecer com um grau de confiança elevado que a mesma não reage exotermicamente com matérias combustíveis.

Antes de realizar o ensaio, é conveniente obter informações sobre eventuais propriedades explosivas da substância.

O método não é aplicável a sólidos, gases e outras substâncias explosivas ou altamente inflamáveis, nem a peróxidos orgânicos.

Não é necessário realizar o ensaio se existirem dados referentes à substância em estudo obtidos por aplicação do ensaio da ONU para líquidos comburentes (1).

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

O tempo médio necessário para o aumento da pressão é a média dos tempos determinados necessários para que a pressão da mistura em estudo aumente de 690 kPa para 2 070 kPa acima da pressão atmosférica.

1.3. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Utiliza-se como substância de referência uma solução aquosa a 65 %, em massa, de ácido nítrico de qualidade analítica ([2]).

([1]) Por exemplo, o ensaio no âmbito da regulamentação da ONU relativa ao transporte de mercadorias perigosas.

([2]) O ácido deve ser titulado antes do ensaio, de modo a confirmar a sua concentração.

▼B

Caso o experimentador preveja que os resultados do ensaio sejam utilizados para outros fins ([1]), pode revelar-se adequado efectuar ensaios com outras substâncias de referência ([2]).

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O líquido em estudo é misturado, na proporção 1:1, em massa, com fibras de celulose, e introduzido num recipiente pressurizado. Se, durante o processo de mistura ou enchimento, ocorrer ignição espontânea, não é necessário prosseguir o ensaio.

Caso não ocorra ignição espontânea, realiza-se o ensaio na sua totalidade. A mistura é aquecida no recipiente pressurizado, determinando-se o tempo médio necessário para que a pressão aumente de 690 kPa para 2 070 kPa acima da pressão atmosférica. Este tempo é comparado com o tempo médio necessário para o aumento da pressão da mistura na proporção de 1:1 da(s) substância(s) de referência com celulose.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Os resultados de uma série de cinco ensaios com uma determinada substância não devem diferir em mais de 30 % da média aritmética. Devem desprezar-se os resultados que mostrem uma divergência superior a 30 % relativamente à média, alterando-se os procedimentos de mistura e enchimento, após o que deve repetir-se o ensaio.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1. **Preparação**

1.6.1.1. *Substância combustível*

Utilizam-se como matéria combustível fibras de celulose secas, de comprimento compreendido entre 50 e 250 μm e diâmetro médio 25 μm ([3]). As fibras são secas a massa constante, numa placa de espessura não superior a 25 mm, a 105 ºC, durante 4 horas, e mantidas num exsicador com exsicante, até ao arrefecimento e utilização. O teor de humidade da celulose seca deve ser inferior a 0,5 % em relação à massa seca ([4]). Para tal, se necessário, deve prolongar-se o tempo de secagem ([5]). Deve utilizar-se o mesmo lote de celulose em todo o ensaio.

([1]) Por exemplo, o ensaio no âmbito da regulamentação da ONU relativa ao transporte de mercadorias perigosas.
([2]) Na referência 1, por exemplo, utilizam-se ácido perclórico a 50 %, em massa, e clorato de sódio a 40 %, em massa.
([3]) Por exemplo, celulose Whatman para cromatografia em coluna, referência CF 11, n.º de catálogo 4021 050.
([4]) Confirmado, por exemplo, através de uma titulação de Karl Fisher.
([5]) Como alternativa, pode obter-se o teor de humidade em causa por aquecimento a 105 ºC, sob vácuo, durante 24 h.

▼B

1.6.1.2. *Equipamento*

1.6.1.2.1. Dispositivo pressurizado

Deve utilizar-se um dispositivo constituído por um recipiente pressurizado de aço de forma cilíndrica, com 89 mm de comprimento e 60 mm de diâmetro externo (ver figura 1). São maquinadas duas superfícies planas em lados opostos, reduzindo a secção local do recipiente para 50 mm, de modo a facilitar a imobilização durante a colocação dos obturadores de ignição e de ventilação. O recipiente, com um diâmetro interno de 20 mm, é rebaixado internamente em ambas as extremidades até uma profundidade de 19 mm e roscado para tubos normalizados BSP (*British Standard Pipe*) de 1", ou o seu equivalente no sistema métrico. É enroscada à superfície curva do recipiente pressurizado uma tomada de pressão, a 35 mm de uma das extremidades, perpendicularmente às superfícies planas maquinadas. O encaixe, roscado para receber a rosca da tomada de pressão (tubo normalizado BSP de 1/2", ou o seu equivalente no sistema métrico), é realizado a uma profundidade de 12 mm. Se necessário, é instalada uma junta de material inerte, de modo a assegurar estanquidade aos gases. A tomada de pressão tem um comprimento exterior de 55 mm relativamente ao corpo do dispositivo e um furo axial com 6 mm de diâmetro. A extremidade da tomada de pressão é rebaixada e roscada de forma a receber um transdutor de pressão com diafragma. Pode utilizar-se qualquer dispositivo de medição de pressão que não seja atacado pelos gases de combustão ou produtos de decomposição e seja adequado a aumentos de pressão de 690-2 070 kPa em não mais de 5 minutos.

A extremidade do recipiente pressurizado mais distante da tomada de pressão é tapada com um obturador de ignição e munida de dois eléctrodos, um dos quais isolado do corpo do obturador e o outro ligado à massa. A extremidade oposta do recipiente é fechada por um disco de ruptura adequado a uma pressão de ruptura de 2 200 kPa, mantido em posição por um obturador de retenção com um furo axial de 20 mm de diâmetro. Se necessário, é instalada uma junta de material inerte, de modo a assegurar estanquidade aos gases. Durante a utilização, o dispositivo é mantido na posição correcta por meio de um suporte (figura 2), geralmente constituído por uma placa de aço macio com 235 mm × 184 mm × 6 mm e um tubo de 185 mm de comprimento e secção quadrada de 70 mm × 70 mm × 4 mm.

São cortados dois lados opostos na extremidade do tubo, de modo a obter uma estrutura constituída por uma secção de tubo intacto com 86 mm de comprimento prolongada por dois lados até à base. As extremidades destes lados são cortadas de modo a formar um ângulo de 60º com a horizontal e soldadas à placa de aço macio que constitui a base. É maquinada num dos lados da extremidade superior da base uma fenda com 22 mm de largura e 46 mm de profundidade, de modo que, ao colocar o dispositivo pressurizado com o obturador de ignição para baixo, a tomada de pressão encaixe na fenda. É soldada à face interna do lado inferior do tubo um espaçador de aço com 30 mm de largura e 6 mm de espessura. O dispositivo pressurizado é mantido firmemente em posição por dois parafusos de orelhas de 7 mm, colocados no lado oposto, e apoiado inferiormente por dois elementos prismáticos de aço de 12 mm de largura e 6 mm de espessura, soldados às peças laterais na base da porção intacta do tubo.

▼B

1.6.1.2.2. Sistema de ignição

O sistema de ignição é constituído por um cabo de níquel-crómio de 25 cm de comprimento e 0,6 mm de secção, com uma resistência de 3,85 ohm/m. O cabo é enrolado em forma de bobina por recurso a uma haste de 5 mm de secção, e ligado aos eléctrodos do obturador de ignição. A bobina deve apresentar uma das configurações que se ilustram na figura 3. A distância entre a extremidade inferior do recipiente e a superfície interior da bobina de ignição deve ser de 20 mm. Caso os eléctrodos não sejam ajustáveis, as extremidades do cabo de ignição entre a bobina e a base do recipiente devem ser isoladas por um elemento de cerâmica. O cabo é aquecido por acção de uma corrente contínua de intensidade mínima 10 A.

1.6.2. **Realização do ensaio** ([1])

O dispositivo completo, incluindo o transdutor de pressão e o sistema de aquecimento, mas sem o disco de ruptura na respectiva posição, é colocado com o obturador de ignição para baixo. Com o auxílio de um agitador de vidro ([2]), misturam-se num recipiente de vidro 2,5 g do líquido em estudo com 2,5 g de celulose seca. Por motivos de segurança, a mistura deve ser executada com um dispositivo de segurança interposto entre o operador e a mistura. Em caso de ignição durante os processos de mistura ou o enchimento, não é necessário prosseguir o ensaio. A mistura é vertida em pequenas porções no recipiente pressurizado, agitando ligeiramente, devendo assegurar-se a acumulação em torno da bobina de ignição, de forma a estabelecer um bom contacto. A bobina não deve ser distorcida durante o processo de enchimento, facto que poderia determinar resultados erróneos ([3]). O disco de ruptura é colocado na respectiva posição e o obturador de retenção enroscado firmemente. O recipiente carregado, com o disco de ruptura no topo, é transferido para o suporte, que deve estar colocado numa chaminé ou câmara com protecção. A fonte de alimentação é ligada aos terminais externos do obturador de ignição, aplicando-se uma corrente de 10 A. O tempo decorrido entre o início da mistura e o estabelecimento da corrente eléctrica não deve exceder 10 minutos.

O sinal produzido pelo transdutor de pressão é transmitido a um sistema adequado que permita a detecção e o registo contínuos da alteração da pressão (por exemplo, um detector em contínuo acoplado a um registador). A mistura é aquecida até à ruptura do disco de ruptura ou até terem decorrido, pelo menos, 60 segundos. Caso o disco não sofra ruptura, deve deixar-se arrefecer a mistura antes de desmontar cuidadosamente o dispositivo, tomando as precauções inerentes a uma eventual pressurização. Realizam-se cinco ensaios com a substância em estudo e a(s) substância(s) de referência. Regista-se o tempo necessário para a pressão aumentar de 690 kPa para 2 070 kPa acima da pressão atmosférica, calculando-se então o tempo médio necessário para o aumento da pressão.

Algumas substâncias produzem um aumento de pressão excessivo ou demasiado reduzido, determinado por reacções químicas independentes das propriedades de comburência das substâncias. Nesses casos, pode ser necessário repetir o ensaio, utilizando uma substância inerte, como, por exemplo, terra de diatomáceas (*kieselguhr*), em vez da celulose, de modo a esclarecer a natureza da reacção.

([1]) As misturas de substâncias comburentes com celulose devem ser consideradas potencialmente explosivas, devendo manipular-se com os devidos cuidados.

([2]) Na prática, pode preparar-se uma quantidade de mistura na proporção 1:1 do líquido em estudo com celulose superior à necessária para o ensaio, transferindo 5 ± 0,1 g da mesma para o recipiente pressurizado. A mistura deve ser preparada antes de cada ensaio.

([3]) Deve evitar-se, em especial, o contacto entre espiras adjacentes da bobina.

▼B

2. **DADOS**

Tempos necessários para o aumento da pressão da(s) substância(s) em estudo e de referência. Tempos necessários para o aumento da pressão no caso dos ensaios com substâncias inertes, se for caso disso.

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Calculam-se os tempos médios necessários para o aumento da pressão da(s) substância(s) em estudo e de referência.

Calcula-se o tempo médio necessário para o aumento da pressão no ensaio com a substância inerte, se realizado.

O quadro 1 fornece alguns exemplos de resultados:

Quadro 1

Exemplos de resultados [a]

Substância [b]	Tempo médio necessário para o aumento da pressão (mistura com celulose na proporção 1:1) (ms)
Solução aquosa saturada de dicromato de amónio	20 800
Solução aquosa saturada de nitrato de cálcio	6 700
Solução aquosa saturada de nitrato férrico	4 133
Solução aquosa saturada de perclorato de lítio	1 686
Solução aquosa saturada de perclorato de magnésio	777
Solução aquosa saturada de nitrato de níquel	6 250
Ácido nítrico a 65 %	4 767 [c]
Ácido perclórico a 50 %	121 [c]
Ácido perclórico a 55 %	59
Solução aquosa a 30 % de nitrato de potássio	26 690
Solução aquosa saturada de nitrato de prata	[d]
Solução aquosa a 40 % de clorato de sódio	2 555 [c]
Solução aquosa a 45 % de nitrato de sódio	4 133
Substância inerte	
Água: celulose	[d]

[a] Ver a referência (1) para a classificação no âmbito da regulamentação da ONU em matéria de transporte de mercadorias perigosas.
[b] As soluções saturadas devem ser preparadas à temperatura de 20ºC.
[c] Valor médio com base em ensaios de comparação interlaboratorial.
[d] Sem atingir a pressão máxima de 2 070 kPa.

▼B

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir as seguintes informações:

— identidade, composição, grau de pureza, etc., da substância em estudo,

— concentração da substância em estudo,

— procedimento utilizado para a secagem da celulose,

— teor de humidade da celulose utilizada,

— resultados das determinações,

— resultados dos ensaios com substâncias inertes, se for caso disso,

— tempos médios necessários para o aumento da pressão determinados,

— quaisquer eventuais alterações do método e respectiva motivação,

— quaisquer informações complementares ou observações úteis para a interpretação dos resultados.

3.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS ([1])

Os resultados do ensaio são interpretados com base nos seguintes critérios:

a) Eventual ignição espontânea da mistura da substância em estudo com celulose; e

b) Comparação do tempo médio necessário para o aumento da pressão de 690 kPa para 2 070 kPa com idêntico parâmetro da(s) substância(s) de referência.

Uma substância líquida é considerada comburente se:

a) Uma mistura da substância com celulose na proporção 1:1, em massa, exibir ignição espontânea; ou

b) Uma mistura na proporção 1:1, em massa, exibir um tempo médio necessário para o aumento da pressão inferior ou igual ao tempo médio necessário para o aumento da pressão de uma mistura na proporção 1:1, em massa, de solução aquosa de ácido nítrico a 65 % (em massa) e celulose.

De modo a evitar falsos resultados positivos, podem ser também tidos em conta na interpretação dos resultados, se tal for considerado necessário, os resultados obtidos num ensaio da substância em estudo com uma substância inerte.

([1]) Ver a referência n.º 1 para a interpretação dos resultados no âmbito da regulamentação da ONU relativa ao transporte de mercadorias perigosas, utilizando várias substâncias de referência.

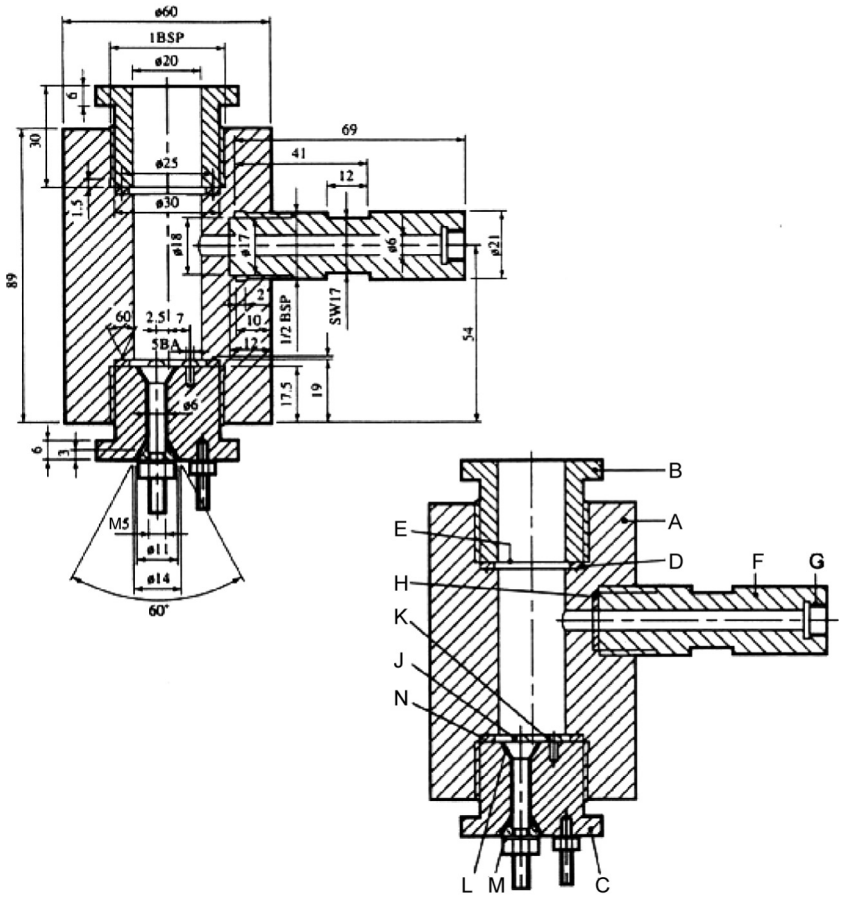
▼B

4. **REFERÊNCIAS**

(1) *Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria*, 3.º edição revista. Publicação da ONU No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, p. 342. *Test 0.2: Test for oxidizing liquids.*

Figura 1

Dispositivo pressurizado



(A) Corpo do recipiente pressurizado

(B) Obturador de suporte do disco de ruptura

(C) Obturador de ignição

(D) Junta de chumbo macio

(E) Disco de ruptura

(F) Tomada de pressão

(G) Cabeça do transdutor de pressão

(H) Junta

(J) Eléctrodo isolado

(K) Eléctrodo ligado à massa

(L) Isolador

(M) Cone de aço

(N) Ranhura de distorção da junta

▼B

Figura 2

Suporte do dispositivo

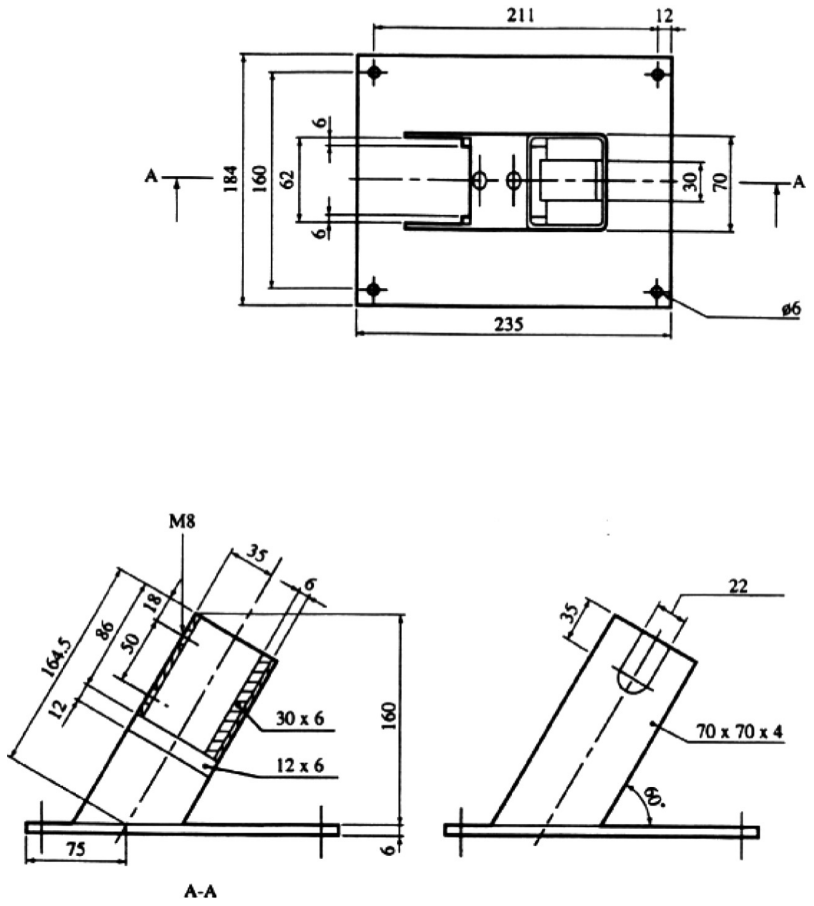
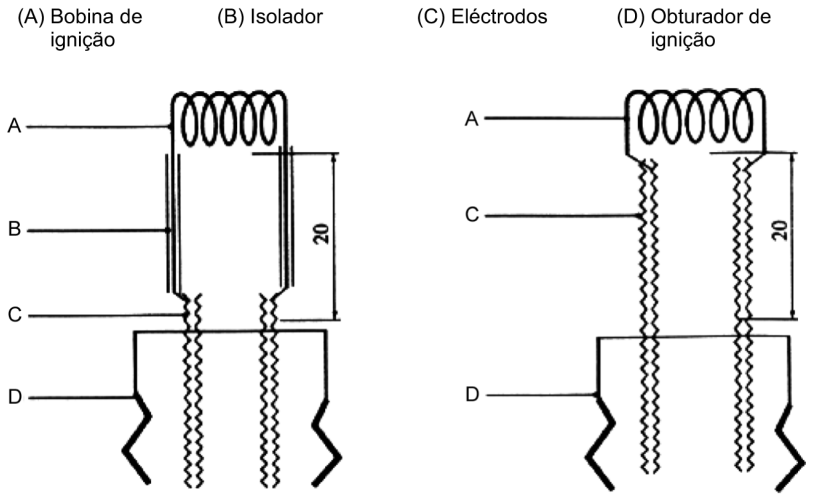


Figura 3

Sistema de ignição



Nota: Cada uma destas duas configurações pode ser utilizada

▼M1

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

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método descreve um procedimento para medição do diâmetro médio geométrico ponderado em função do comprimento (LWGMD) de lotes de fibras minerais artificiais (FMA). Dado que o LWGMD do material terá uma probabilidade de 95 % de se encontrar no interior dos níveis de confiança a 95 % (LWGMD ± dois desvios-padrão) da amostra, o valor apresentado (resultado do teste) será o valor inferior do intervalo de confiança a 95 % da amostra (ou seja, LWGMD — 2 desvios-padrão). O método baseia-se numa actualização (Junho de 1994) de um projecto de procedimento industrial do HSE (Departamento de Saúde e Segurança Britânico) adoptado numa reunião entre o ECFIA e o HSE em Chester, em 26/9/93, e desenvolvido para e por um segundo ensaio interlaboratorial (1, 2). Este método de medição pode ser utilizado para caracterizar o diâmetro das fibras em lotes de substâncias ou produtos que contenham FMA, nomeadamente fibras cerâmicas refractárias (FCR), fibras vítricas artificiais (FVA), fibras cristalinas e fibras policristalinas.

A ponderação em função do comprimento é uma forma de compensar o efeito de distribuição dos diâmetros causada pela quebra das fibras longas durante a amostragem ou manuseamento dos materiais. Na medição da distribuição por tamanhos do diâmetro das FMA utilizam-se métodos estatísticos geométricos (média geométrica), visto que essa distribuição se aproxima geralmente da distribuição logarítmica normal.

A medição do comprimento em complemento da medição do diâmetro é tediosa e demorada, mas se se medirem apenas as fibras que tocam uma linha infinitamente fina em cada campo de visão do miscroscópio electrónico, a probabilidade de que uma determinada fibra seja seleccionada é proporcional ao seu comprimento. Na medida em que esse facto resolve a questão do comprimento e da sua ponderação nos cálculos, a única medição necessária é a do diâmetro, e o LWGMD-2SD pode ser calculado como se descreve.

1.2. DEFINIÇÕES

Partícula: Um objecto em que a relação do comprimento com a espessura é menor do que 3:1.

Fibra: Um objecto em que a relação do comprimento com a espessura (razão de forma) é igual ou superior a 3:1.

1.3. ÂMBITO E LIMITAÇÕES

O método foi concebido para a análise da distribuição dos diâmetros nos casos em que o diâmetro médio varia entre 0,5 μm e 6 μm. Os diâmetros superiores podem ser medidos utilizando a microscopia electrónica com menor ampliação, mas o método terá limitações cada vez maiores quanto mais finas sejam as fibras, pelo que se recomenda, quando o diâmetro médio for inferior a 0,5 μm, a utilização de um microscópio electrónico de transmissão (MET) para a medição do diâmetro das fibras.

▼M1

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Retira-se um determinado número de amostras representativas das mantas de fibra ou dos lotes de fibras soltas. Reduz-se o comprimento das fibras através de um procedimento de esmagamento e dilui-se em água uma subamostra representativa. Extraem-se aliquotas que são filtradas em filtro de policarbonato com uma dimensão de poro de 0,2 μm e preparadas para serem examinadas utilizando técnicas de microscopia electrónica de varrimento (MEV). O diâmetro das fibras é medido com uma ampliação de 10 000 x ou superior ([1]) utilizando o método da intersecção com uma linha para obtenção de uma estimativa do diâmetro médio não afectada de erro sistemático. O limite inferior do intervalo de confiança a 95 % (com base num teste unicaudal) é calculado para obter uma estimativa do valor inferior da média geométrica do diâmetro das fibras presentes no material.

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1. **Segurança/precauções**

A exposição física às fibras em suspensão no ar deve ser reduzida ao mínimo, pelo que o manuseamento das fibras secas deve ser feito em câmara de fluxo laminar (*hotte*) ou caixa de luvas. A exposição física deve ser objecto de seguimento periódico que permita avaliar a eficácia dos métodos de controlo. Durante o manuseamento de FMA, devem ser utilizadas luvas descartáveis, para reduzir a irritação da pele e para evitar a contaminação cruzada.

1.5.2. **Aparelhos / equipmento**

— Prensa (capaz de produzir 10 MPa) e cadinhos,

— Filtros capilares de policarbonato com diâmetro de poro de 0,2 μm (25 mm de diâmetro),

— Filtro de membranas em éster de celulose com diâmetro de poro de 5 μm, para suporte durante a filtração,

— Aparelho de filtração em vidro (ou sistema de filtração descartável) que aceite filtros de 25 mm de diâmetro (p.ex.: sistema de microanálise em vidro da Millipore, tipo XX10 025 00),

— Água recém-destilada filtrada a 0,2 μm para remoção dos microorganismos,

— Aparelho de revestimento a quente com eléctrodo em ouro ou ouro/paládio,

— Microscópio electrónico de varrimento com capacidade de resolução a 10 nm e com ampliação de 10 000 x,

— Diversos: espátulas, lâmina de bisturi tipo 24, tesouras, tubos de MEV, cola ou fita adesiva de carbono, prata coloidal,

— Sonda de ultra-sons ou banho ultra-sónico de bancada,

— Amostrador ou sonda para recolha de amostras cilíndricas das mantas de FMA.

([1]) Esta é a ampliação indicada para as fibras de 3 μm; no caso das fibras de 6 μm poderá ser mais indicado utilizar uma ampliação de 5 000 x.

▼M1

1.5.3. **Procedimento de ensaio**

1.5.3.1. *Amostragem*

No caso das mantas e placas, um amostrador ou sonda de 25 mm de diâmetro é utilizado para a recolha de amostras em toda a secção. Essas amostras devem ser igualmente espaçadas por toda a largura nas peças pequenas ou retiradas aleatoriamente de diversas áreas quando as peças sejam longas. O mesmo equipamento pode ser utilizado para retirar amostras aleatórias no caso de fibras soltas. Quando possível, devem ser retiradas seis amostras, por forma a reflectir as variações espaciais do material.

Esmaga-se as seis amostras num cadinho de 50 mm de diâmetro a 10 MPa. O material é re-homogeneizado com uma espátula e prensado uma segunda vez a 10 Mpa, podendo depois ser removido do cadinho e armazenado num frasco de vidro selado.

1.5.3.2. *Preparação das amostras*

Se necessário, qualquer ligante orgânico poderá ser removido colocando a fibra numa estufa a 450 °C durante cerca de uma hora.

Formar um cone e dividir em quatro para obter subamostras (este passo deve ser realizado em câmara de fluxo laminar).

Utilizando uma espátula, adicionar uma pequena quantidade (< 0,5 g) de amostra a 100 ml de água acabada de destilar e filtrada através de um filtro de membrana de 0,2 μm (poderão ser utilizadas fontes alternativas de água ultrapura, desde que se demonstre que a sua qualidade é satisfatória). Dispersar totalmente utilizando uma sonda de ultra-sons com uma potência de 100 W regulada de forma a produzir cavitação. (Se esse tipo de sonda não estiver disponível, utilizar o seguinte método: agitar e inverter a amostra repetidamente durante 30 segundos; passar por ultra-sons num banho ultra-sónico de bancada durante cinco minutos; voltar a agitar e inverter repetidamente durante mais 30 segundos).

Imediatamente após a dispersão da fibra, remover um determinado número de aliquotas (p.ex.: três aliquotas de 3, 6 e 10 ml) utilizando uma pipeta de boca larga (com uma capacidade de 2 a 5 ml).

Filtrar todas as aliquotas em vácuo através de um filtro de policarbonato com poro de 0,2 μm, suportado por um filtro de suporte MEC com poro de 5 μm, utilizando um funil de filtração em vidro de 25 mm com um reservatório cilíndrico. Colocam-se primeiro cerca de 5 ml da água destilada filtrada no funil e a aliquota é depois lentamente pipetada para a água com a ponta da pipeta abaixo do menisco. A pipeta e o reservatório devem ser cuidadosamente lavadas depois de pipetar, dado que as fibras mais finas têm tendência para se concentrarem perto da superfície.

Remover cuidadosamente o filtro e separá-lo do filtro de suporte antes de o colocar num recipiente para secagem.

▼M1

Cortar uma secção de um quarto ou metade do filtrado com uma lâmina de bisturi de tipo 24, fazendo movimentos laterais durante o corte. Colar cuidadosamente a secção cortada num suporte de SEM utilizando fita ou cola de carbono. Aplicar prata coloidal em pelo menos três sítios para melhorar o contacto eléctrico entre a borda do filtro e o suporte. Quando a cola/prata coloidal estiverem secos, revestir a superfície do depósito a quente com aproximadamente 50 nm de ouro ou de ouro/paládio.

1.5.3.3. *Calibração e operação do MEV*

1.5.3.3.1. Calibração

A calibração do MEV deve ser verificada pelo menos uma vez por semana (idealmente uma vez por dia) utilizando uma grelha de calibração normalizada. A calibração deve ser verificada utilizando uma amostra-padrão, e se o valor medido (MEV) não se encontrar num intervalo de ± 2 % do respectivo valor, o MEV deve ser novamente calibrado e o procedimento de verificação deve ser repetido.

O MEV deve ter uma resolução que permita um diâmetro mínimo de campo de pelo menos 0,2 μm, utilizando uma matriz de amostra real, com uma ampliação de 2 000 x.

1.5.3.3.2. Operação

O MEV deve ser operado com uma ampliação de 10 000 x ([1]) em condições que permitam uma boa resolução, com imagem aceitável, a baixas velocidades de varrimento, por exemplo de 5 segundos por imagem. Embora os parâmetros operacionais de diferentes MEV possam variar, em geral obtém-se a melhor visibilidade e resolução, em materiais de peso atómico relativamente baixo, utilizando voltagens de aceleração de 5-10 keV e trabalhando com um pequeno diâmetro de feixe (*spot size*) e com uma distância de trabalho curta. Dado que se vai utilizar a linha mediana como referência, deve utilizar-se uma inclinação de 0º, para evitar a necessidade de voltar a focar ou, no caso de MEV com um módulo eucêntrico, utilizar a distância de trabalho eucêntrica. Pode trabalhar-se com menor ampliação desde que o material não contenha nenhuma fibra de pequeno diâmetro e que o diâmetro das fibras seja grande (> 5 μm).

1.5.3.4. *Medição do diâmetro*

1.5.3.4.1. Exame com baixa ampliação para avaliação da amostra

A amostra deve ser inicialmente examinada com baixa ampliação para verificar se não existem aglomerados de fibras de grandes dimensões e para avaliar a densidade de fibras na amostra. Caso haja muita aglomeração, recomenda-se a preparação de uma nova amostra.

Para fins de exactidão estatística, é necessário proceder à medição de um número mínimo de fibras, pelo que poderá parecer desejável dispor de maior densidade de fibras, na medida em que o exame de campos vazios leva tempo e não contribui em nada para a análise. No entanto, se o filtro estiver sobrecarregado, torna-se difícil medir o diâmetro de todas as fibras e as fibras de menor diâmetro podem ser escondidas por outras de maior diâmetro.

([1]) Para as fibras de 3 μm, ver a nota de pé de página anterior.

▼M1

Uma densidade de fibras superior a 150 fibras por milímetro linear poderá resultar numa sobreestimação do LWGMD. Por outro lado, a baixa concentração de fibras aumentará o tempo necessário para a análise, pelo que frequentemente é mais útil preparar uma nova amostra com uma densidade de fibras próxima da ideal do que persistir nas contagens de filtros em que a concentração de fibras é baixa. A densidade ideal das fibras deverá resultar, em média, em uma ou duas fibras que podem ser medidas por cada campo de visão, com uma ampliação de 5 000 x. A densidade ideal depende, contudo, do diâmetro das fibras, pelo que é necessário que o operador utilize a sua experiência e discernimento para decidir se a densidade de fibras está ou não próxima do ideal.

1.5.3.4.2. Ponderação do diâmetro das fibras em função do comprimento

Só devem ser contadas as fibras que toquem (ou interceptem) uma linha (infinitamente) fina traçada no ecrã do MEV. Para tal, deve ser traçada no centro do ecrã uma linha horizontal (ou vertical).

Em alternativa, pode colocar-se um ponto no centro do ecrã e proceder depois a um exame linear contínuo ao longo do filtro numa determinada direcção. O diâmetro de todas as fibras com uma razão de forma superior a 3:1 que toquem ou interceptem esse ponto deverá ser medido e registado.

1.5.3.4.3. Medição das fibras

Recomenda-se que sejam medidas pelo menos 300 fibras. Cada fibra deve ser medida uma única vez no ponto de intersecção com o ponto ou linha traçados no ecrã (ou perto do ponto de intersecção se a parede exterior da fibra estiver escondida). Caso se encontrem fibras de secção irregular, deve ser feita uma medição que represente o diâmetro médio da fibra. Os pontos de medição na parede exterior da fibra devem ser cuidadosamente definidos antes da medição da distância que separa os dois pontos opostos. A medição pode ser efectuada em linha, no ecrã, ou *a posteriori*, em imagens armazenadas ou fotografias. Recomenda-se a utilização de sistemas semi-automáticos de medição em imagens que transferem os dados directamente para uma folha de cálculo, na medida em que permitem poupar tempo, eliminar os erros de transcrição e automatizar o processo de cálculo.

As extremidades das fibras mais longas devem ser observadas a baixa ampliação para verificar se não estão a encaracolar de volta para o campo de visão, por forma a garantir que só sejam medidas uma única vez.

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Geralmente, os diâmetros das fibras não apresentam uma distribuição normal. No entanto, é possível obter uma distribuição que se aproxima da normal através de uma transformação logarítmica.

Calcular a média aritmética (lnD médio) e o desvio-padrão (SD_{lnD}) dos valores do logaritmo neperiano (lnD) dos n diâmetros de fibra (D).

$$\text{médio } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum (lnD - médio\ lnD)^2}{n-1}} \quad (2)$$

O desvio-padrão é dividido pela raíz quadrada do número de medições (n) para obter o erro-padrão (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Substrair o dobro do erro-padrão da média e calcular o exponencial desse valor (média menos dois erros-padrão) para obter a média geométrica menos dois erros-padrão geométricos.

$$LWGMD - 2SE = e^{(médio\ lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS**

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir pelo menos a seguinte informação:

— Valor de LWGMD-2SE.

— Todos os desvios, em particular os que possam ter efeitos sobre a precisão ou a fiabilidade dos resultados, com a devida justificação.

4. **BILBLIOGRAFIA**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

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

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 123 (2006) da OCDE. O método da agitação lenta permite determinar com exatidão valores de coeficiente de partição 1-octanol/água (P_{OW}) até log P_{OW} = 8,2 (1). É, portanto, um método experimental adequado para a determinação direta do P_{OW} de substâncias fortemente hidrofóbicas.

2. Outros métodos de determinação do coeficiente de partição 1-octanol/água (P_{OW}) são o método dito "do frasco com agitação" (2) e o método de determinação do P_{OW} com base nos fenómenos de retenção em HPLC de inversão de fases (3). O método do frasco com agitação pode conduzir a resultados anómalos, devido à transferência de microgotículas de octanol para a fase aquosa. À medida que aumenta o valor de P_{OW}, a presença dessas gotículas na fase aquosa leva a que a concentração da substância em estudo nessa fase seja cada vez mais sobrestimada. A utilização desse método está, portanto, limitada a substâncias com P_{OW} inferior a 4. O segundo método utiliza valores consistentes de P_{OW}, determinados diretamente, para calibrar a relação entre os fenómenos de retenção em HPLC e os valores medidos de P_{OW}. Existia um projeto de orientações da OCDE para a determinação de coeficientes de partição 1-octanol/água de substâncias ionizáveis, que foi abandonado (4).

3. O presente método foi desenvolvido nos Países Baixos. A precisão das metodologias descritas neste método foi validada e otimizada num estudo de validação interlaboratorial em que participaram 15 laboratórios (5).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Significado e utilização

4. Foram identificadas relações muito significativas entre o coeficiente de partição 1-octanol/água (P_{OW}) de substâncias orgânicas inertes e a bioacumulação dessas substâncias nos peixes. Além disso, demonstrou-se a existência de uma correlação entre o P_{OW} e a toxicidade para os peixes e entre o P_{OW} e a sorção dos produtos químicos por meios sólidos, como solos e sedimentos. A referência 6 descreve exaustivamente essas relações.

5. Concluiu-se que existe uma grande variedade de relações entre o coeficiente de partição 1-octanol/água e outras propriedades das substâncias, com importância ao nível da química e toxicologia ambientais. Assim, o coeficiente de partição 1-octanol/água tem vindo a tornar-se um parâmetro fundamental na avaliação do risco ambiental dos produtos químicos e na previsão do destino desses produtos no ambiente.

Âmbito de aplicação

6. O método da agitação lenta foi concebido para reduzir a formação de microgotículas de 1-octanol na fase aquosa. Nessas condições, já não se verifica a sobrestimação da concentração na fase aquosa, devida à associação de moléculas da substância em estudo a essas gotículas. O método da agitação lenta é, portanto, particularmente adequado para a determinação do P_{OW} de substâncias com log P_{OW} previsto igual ou superior a 5, caso em que o método do frasco com agitação (2) tende a fornecer resultados erróneos.

▼M4

DEFINIÇÃO E UNIDADES

7. O coeficiente de partição de uma substância entre a água e um solvente lipofílico (1-octanol) caracteriza a distribuição no equilíbrio do produto químico entre as duas fases. O coeficiente de partição entre a água e o 1--octanol (P_{OW}) é definido como a razão entre a concentração, no equilíbrio (C_O), da substância em estudo em 1-octanol saturado com água e a concentração, no equilíbrio (C_W), da substância em estudo em água saturada com 1-octanol.

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Como se trata de um quociente de concentrações, é uma grandeza adimensional. É mais frequentemente apresentado como logaritmo decimal (log P_{OW}). Dado que o P_{OW} depende da temperatura, os dados apresentados devem mencionar a temperatura das determinações.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

8. Para a determinação do coeficiente de partição, estabelece-se um equilíbrio entre a água, o 1-octanol e a substância em estudo, a temperatura constante, determinando-se em seguida a concentração da substância em estudo nas duas fases.

9. As dificuldades experimentais ligadas à formação de microgotículas durante o ensaio do frasco com agitação podem ser atenuadas no ensaio de agitação lenta aqui proposto. No ensaio de agitação lenta, estabelece-se um equilíbrio entre a água, o 1-octanol e a substância em estudo, num reator com agitação termostatizado. As transferências de uma fase para a outra são aceleradas pela agitação. Esta provoca um grau de turbulência limitado, que favorece as transferências entre o 1-octanol e a água, sem formação de microgotículas (1).

APLICABILIDADE DO ENSAIO

10. Dado que a presença de substâncias diversas da substância em estudo pode influenciar o coeficiente de atividade desta última, a substância em estudo utilizada nos ensaios deve ser pura. Na determinação de coeficientes de partição 1-octanol/água devem ser utilizadas substâncias com o maior grau de pureza disponível no comércio.

11. O presente método aplica-se a substâncias puras que não se dissociem nem associem, nem apresentem atividade interfacial significativa. Pode utilizar-se na determinação do coeficiente de partição 1-octanol/água de substâncias com essas características ou de misturas dessas substâncias. Se o método for utilizado para misturas, os coeficientes de partição 1-octanol/água determinados dependerão da composição química da mistura estudada e da composição eletrolítica da fase aquosa. Desde que seja devidamente complementado, o método também é aplicável a compostos dissociáveis ou associáveis (ver o ponto 12).

12. Devido aos equilíbrios múltiplos que se geram na água e no 1-octanol e influenciam a partição 1-octanol/água das substâncias dissociáveis, como os ácidos orgânicos e os fenóis, as bases orgânicas e as substâncias organometálicas, o coeficiente de partição 1-octanol/água é uma constante fortemente dependente da composição eletrolítica (7)(8). A determinação deste coeficiente exige, portanto, o controlo e registo do pH e da composição eletrolítica durante o ensaio. A avaliação de coeficientes de partição cabe a especialistas. Com base na(s) constante(s) de dissociação, há que selecionar valores de pH adequados, de modo a poder determinar-se um coeficiente de partição para cada estado de ionização. O estudo de compostos organometálicos exige a utilização de tampões não complexantes (8). As condições experimentais devem ser escolhidas tendo em conta os conhecimentos atuais no domínio da química em fase aquosa (constantes de complexação, constantes de dissociação) e de modo a poder prever-se que espécies da substância em estudo estarão presentes nessa fase. A força iónica deverá ser a mesma em todos os ensaios efetuados, utilizando-se para o efeito um eletrólito apropriado.

▼M4

13. As substâncias com baixa hidrossolubilidade ou P_{OW} elevado podem dificultar os ensaios, devido ao facto de as concentrações na fase aquosa se tornarem muito baixas e ser difícil a sua determinação rigorosa. Na descrição deste método de ensaio explica-se como ultrapassar o problema.

INFORMAÇÕES SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

14. Os reagentes químicos devem ser de qualidade analítica ou de grau de pureza superior. Recomenda-se a utilização de substâncias em estudo não marcadas, de composição química conhecida (de preferência, pelo menos 99 % puras), ou marcadas com isótopos radioativos, de composição química e grau de pureza radioquímica conhecidos. No caso de marcadores com período de semidesintegração curto, será necessário efetuar as correções devidas à desintegração. No caso de substâncias em estudo marcadas com isótopos radioativos, deve recorrer-se a um método analítico específico da substância, para garantir que a radioatividade medida esteja diretamente relacionada com a substância em causa.

15. Pode estimar-se o log P_{OW} utilizando *software* disponível no mercado para esse efeito, ou com base na razão entre a solubilidade em cada um dos solventes.

16. Antes de se proceder a um ensaio de agitação lenta para determinação de um P_{OW}, deve dispor-se das seguintes informações sobre a substância em estudo:

a) fórmula estrutural;

b) métodos analíticos adequados para determinar a concentração da substância em água e em 1-octanol;

c) constante(s) de dissociação, no caso das substâncias ionizáveis (Orientações n.º 112 da OCDE) (9);

d) hidrossolubilidade (10);

e) hidrólise abiótica (11);

f) biodegradabilidade "fácil" (12);

g) pressão de vapor (13).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Material e aparelhagem

17. É necessário o material de laboratório de uso corrente, nomeadamente o seguinte:

— agitadores magnéticos e barras magnéticas revestidas de Teflon, para agitar a fase aquosa,

— aparelhagem analítica adequada para determinar as concentrações esperadas da substância em estudo,

— recipiente de agitação com uma torneira no fundo. Em função do log P_{OW} previsto e do limite de deteção (LOD) do composto em estudo, ponderar-se-á a utilização de um recipiente de reação com a mesma geometria e volume superior a um litro, para se obter um volume de água suficiente para a extração e a análise químicas. Este procedimento permitirá obter concentrações mais elevadas no extrato aquoso e possibilitará, portanto, uma determinação analítica mais fiável. Figura no apêndice 1 um quadro de estimativas do volume mínimo necessário, em função do LOD, do log P_{OW} estimado e da hidrossolubilidade do composto. O quadro tem por base a relação entre o log P_{OW} e a razão das solubilidades em octanol e em água, segundo Pinsuwan *et al.* (14):

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

▼M4

em que:

$SR = S_{octanol}/S_{água}$ (em molaridade),

bem como a relação apresentada por Lyman (15) para estimativas de hidrossolubilidade. As hidrossolubilidades calculadas através da equação do apêndice 1 devem considerar-se uma primeira estimativa. Note-se que o utilizador é livre de efetuar estimativas da hidrossolubilidade por meio de qualquer correspondência que se considere representar melhor a relação entre a hidrofobicidade e a solubilidade. Por exemplo, no caso dos compostos sólidos, recomenda-se que o ponto de fusão seja tido em conta nas previsões de solubilidade. Se for utilizada uma equação modificada, deve garantir-se a validade da equação utilizada para o cálculo da solubilidade em octanol. A figura do apêndice 2 esquematiza um recipiente de agitação, com camisa de vidro, com cerca de um litro de capacidade. As proporções do recipiente ilustrado no apêndice 2 revelaram-se favoráveis e, se forem utilizados recipientes de volume diferente, devem ser mantidas;

— um meio de manter a temperatura constante (aspeto essencial) durante o ensaio com agitação lenta.

18. Os recipientes devem ser de um material inerte, para que a adsorção à sua superfície seja insignificante.

Preparação das soluções a utilizar nos ensaios

19. A determinação do P_{OW} deve ser efetuada com 1-octanol do grau de pureza mais elevado disponível no mercado (grau de pureza mínimo de 99 %). Recomenda-se a purificação do 1-octanol por extração ácida, básica e com água, seguida de secagem. Também pode purificar-se o 1-octanol por destilação. Na preparação das soluções-padrão da substância em estudo deve utilizar-se 1-octanol purificado. A água a utilizar na determinação do P_{OW} deve ser destilada em material de vidro ou de quartzo ou ser proveniente de um sistema de purificação ou ser própria para HPLC. A água destilada deve ser filtrada através de um filtro de 0,22 μm e devem ser previstos ensaios em branco, para verificar se os extratos concentrados contêm impurezas que possam interferir com a substância em estudo. Caso se utilize um filtro de fibra de vidro, este deve ser limpo por aquecimento em estufa, durante pelo menos três horas, a 400 °C.

20. Antes do ensaio, os solventes são mutuamente saturados e levados ao equilíbrio num recipiente suficientemente grande. Para o efeito, o sistema constituído pelas duas fases é mantido sob agitação durante dois dias.

21. Toma-se e dissolve-se em 1-octanol (saturado com água) um volume apropriado, à concentração requerida, da substância em estudo. O coeficiente de partição 1-octanol/água tem de ser determinado em soluções diluídas em 1--octanol e em água. A concentração da substância em estudo não deve, portanto, exceder 70 % da solubilidade desta, sendo 0,1 M a concentração máxima em cada fase (1). As soluções de 1-octanol utilizadas no ensaio não podem conter partículas sólidas, em suspensão, da substância em estudo.

22. Dissolve-se em 1-octanol (saturado com água) uma quantidade apropriada da substância em estudo. Se for previsto um log P_{OW} superior a cinco, as soluções de 1-octanol utilizadas no ensaio não devem conter partículas sólidas, em suspensão, da substância em estudo. Para o efeito, proceder-se-á do seguinte modo, no caso dos produtos químicos com log P_{OW} superior a 5:

— dissolve-se a substância em estudo em 1-octanol (saturado com água),

▼M4

— deixa-se a solução em repouso durante um período suficiente para que a substância sólida em suspensão deposite. Durante a decantação, mede-se continuamente a concentração da substância em estudo,

— depois de as concentrações medidas na solução de 1-octanol terem estabilizado, dilui-se a solução de reserva com um volume apropriado de 1-octanol,

— determina-se a concentração da solução de reserva diluída. Se a concentração determinada for coerente com a diluição, pode utilizar-se a solução de reserva diluída no ensaio de agitação lenta.

Extração e análise das amostras

23. Na determinação da substância em estudo deve utilizar-se um método analítico validado. Os investigadores terão de demonstrar que, durante o ensaio, as concentrações na fase de 1-octanol saturado em água e na fase aquosa saturada em 1-octanol são superiores ao limite de quantificação do método analítico utilizado. Se houver que recorrer a métodos de extração, será necessário determinar as recuperações analíticas da substância em estudo da fase aquosa e da fase de 1-octanol. O sinal analítico deve ser corrigido em função dos brancos e devem tomar-se as precauções necessárias para não haver transferências da substância em análise entre amostras.

24. Antes da análise, e em caso de concentrações baixas de substâncias em estudo hidrofóbicas na fase aquosa, é provável que seja necessário extrair a fase aquosa com um solvente orgânico e preconcentrar o extrato. Pela mesma razão, é necessário reduzir as concentrações finais nos brancos. Para o efeito, há que utilizar solventes de elevada pureza, de preferência solventes para análise de resíduos. Por outro lado, a utilização de material de vidro cuidadosamente limpo (por lavagem com solventes ou aquecimento a alta temperatura) pode ajudar a evitar contaminações cruzadas.

25. Para estimar o valor de log P_{OW}, pode utilizar-se um programa de estimativas ou recorrer-se a uma avaliação especializada. Se o valor for superior a 6, terá de se prestar muita atenção às correções em função dos brancos e às transferências da substância em análise. Além disso, se a estimativa de log P_{OW} for superior a 6, é obrigatório utilizar um padrão paralelo para corrigir a taxa de recuperação, de modo a obterem-se fatores de preconcentração elevados. Existem no mercado vários programas de *software* que fornecem estimativas de log P_{OW}, nomeadamente o Clog P (16), o KOWWIN (17), o ProLogP (18) e o ACD log P (19) ([1]). As referências 20 a 22 descrevem os métodos de estimativa.

26. Os limites de quantificação (LOQ) da substância em estudo em 1-octanol e em água determinam-se por métodos bem estabelecidos. Como regra prática, o limite de quantificação de um método corresponde à concentração em água ou em 1-octanol que gera um sinal dez vezes mais intenso que o ruído. Há que escolher um método adequado de extração e de preconcentração e também que especificar as recuperações analíticas. Deve selecionar-se um fator de preconcentração adequado, que permita obter sinais da intensidade requerida na determinação analítica.

([1]) Esta informação é prestada apenas a título indicativo. Podem ser utilizados programas informáticos equivalentes, desde que permitam obter resultados comprovadamente idênticos.

▼M4

27. Com base nos parâmetros do método analítico e nas concentrações esperadas, define-se um tamanho de amostra aproximado para a determinação rigorosa da concentração do composto em causa. Para se obterem sinais analíticos suficientes, deve evitar-se a utilização de amostras aquosas demasiado pequenas. Também deve evitar-se utilizar amostras aquosas demasiado grandes; caso contrário, a água disponível pode não ser suficiente para o número mínimo de análises exigido (n = 5). No apêndice 1, apresenta-se o volume mínimo de amostra em função do volume do recipiente, do LOD da substância em estudo e da solubilidade desta última.

28. A quantificação das substâncias em estudo efetua-se por comparação com curvas de calibração do composto em causa. As concentrações nas amostras analisadas devem estar compreendidas entre concentrações de padrões.

29. No caso das substâncias cuja estimativa de log P_{OW} seja superior a 6, há que adicionar um padrão paralelo à amostra aquosa antes da extração, para contabilizar as perdas ocorridas durante a extração e a preconcentração de amostras aquosas. Para possibilitar uma correção rigorosa da taxa de recuperação, os padrões paralelos devem ter propriedades muito próximas ou idênticas às da substância em estudo. De preferência, são utilizados análogos das substâncias em causa marcados com isótopos estáveis (por exemplo, análogos perdeuterados ou marcados com ^{13}C). Se não for possível utilizar isótopos marcadores estáveis (^{13}C ou ^{2}H), haverá que demonstrar, com base em dados fiáveis recolhidos na literatura científica, que as propriedades físico-químicas do padrão paralelo são muito próximas das propriedades da substância em estudo. Durante a extração líquido-líquido da fase aquosa, podem formar-se emulsões. Estas podem reduzir-se por adição de sal ou deixando-as decantar de um dia para o outro. Os métodos utilizados para extrair e preconcentrar as amostras devem ser indicados nos relatórios.

30. Antes de serem analisadas, as amostras tomadas da fase de 1-octanol podem, se necessário, diluir-se com um solvente adequado. Além disso, no caso das substâncias cujos ensaios de recuperação revelem grandes variações nos mesmos (desvio-padrão relativo superior a 10 %), recomenda-se a utilização de padrões paralelos, para corrigir as taxas de recuperação.

31. Os relatórios devem incluir uma descrição do método analítico que incida na técnica de extração, nos fatores de preconcentração e de diluição, nos parâmetros instrumentais, nas rotinas e no intervalo de calibração, na recuperação analítica da substância em estudo da fase aquosa, na adição de padrões paralelos para corrigir as taxas de recuperação, nos valores dos brancos e nos limites de deteção e de quantificação.

Realização do ensaio

Razões volumétricas 1-octanol/água ótimas

32. Ao escolher os volumes de água e de 1-octanol deve ter-se em conta o seguinte: o limite de quantificação em 1-octanol e em água, os fatores de preconcentração aplicados às amostras de água, os volumes das amostras de 1-octanol e de água colhidas e as concentrações previstas. Por razões experimentais, o volume de 1-octanol no sistema em agitação lenta deve ser escolhido de forma a obter-se uma fase de 1-octanol suficientemente espessa (mais de 0,5 cm), para que seja possível colher amostras dessa fase sem a perturbar.

33. Na determinação de compostos com log P_{OW} igual ou superior a 4,5, a relação entre os volumes de cada fase habitualmente utilizados é de 20 ml a 50 ml de 1-octanol para 950 ml a 980 ml de água, num recipiente de um litro.

▼M4

Condições de realização do ensaio

34. O recipiente de reação deve manter-se termostatizado durante o ensaio, de modo que as variações de temperatura sejam inferiores a 1 °C. O ensaio deve ser efetuado a 25 °C.

35. Deve proteger-se o dispositivo experimental da luz solar, efetuando o ensaio em câmara escura ou cobrindo o recipiente de reação com folha de alumínio.

36. Deve efetuar-se o ensaio num ambiente tão isento de poeiras quanto possível.

37. Agita-se o sistema 1-octanol/água até se atingir o equilíbrio. O período necessário é determinado num ensaio-piloto com agitação lenta, recolhendo-se regularmente amostras de água e de 1-octanol. O intervalo mínimo entre a colheita de amostras consecutivas é de cinco horas.

38. A determinação de um P_{OW} deve basear-se em, pelo menos, três ensaios com agitação lenta independentes.

Determinação do tempo necessário para atingir o equilíbrio

39. Considera-se que se atingiu o equilíbrio quando o gráfico da razão de concentrações 1-octanol/água em função do tempo, num período que abranja 4 momentos de colheita de amostras, se caracterizar por um declive não significativamente diferente de zero, para $p = 0,05$ (limite de confiança de 95 %). Deve atingir-se o equilíbrio pelo menos um dia antes de se iniciar a colheita de amostras. Como regra prática, a colheita de amostras de substâncias cuja estimativa de log P_{OW} seja inferior a 5 pode ter lugar ao segundo e ao terceiro dias. Caso se trate de substâncias particularmente hidrofóbicas, o período necessário para se atingir o equilíbrio pode ter de ser alargado. No caso de um composto com log P_{OW} de 8,23 (decaclorobifenilo), bastaram 144 horas para se atingir o equilíbrio. As amostras para determinação do estado de equilíbrio colhem-se num único recipiente.

Início do ensaio

40. No início do ensaio, enche-se o recipiente de reação com água saturada de 1-octanol. Deve esperar-se tempo suficiente para atingir a temperatura termostatizada.

41. Adiciona-se cuidadosamente ao recipiente de reação a quantidade pretendida da substância em estudo dissolvida no volume requerido de 1-octanol saturado com água. Esta etapa é crucial no ensaio, havendo que evitar uma mistura turbulenta das duas fases. Para o efeito, pode pipetar-se lentamente o 1-octanol contra a parede do recipiente, junto à superfície da água, de modo que escorra ao longo da parede de vidro e forme um filme por cima da fase aquosa. É totalmente de excluir que o 1-octanol seja simplesmente vertido para o recipiente. É igualmente de excluir que se deixem cair gotas de 1-octanol diretamente na água.

42. Depois de iniciada a agitação, deve aumentar-se gradualmente a velocidade desta. Se o motor de agitação não puder ser convenientemente regulado, deve ponderar-se a utilização de um transformador. Importa regular a velocidade de agitação de modo a formar-se um vórtice de profundidade compreendida entre 0,5 cm e 2,5 cm na interface entre a água e o 1-octanol. Se a profundidade do vórtice exceder 2,5 cm, deve reduzir-se a velocidade de agitação; caso contrário, poderão formar-se microgotículas na fase aquosa, a partir das gotas de 1-octanol geradas, com a consequente sobrestimação da concentração da substância em estudo na água. A velocidade de agitação que gera o vórtice máximo de 2,5 cm é recomendada com base nas conclusões de um estudo de validação interlaboratorial (5). Constitui um compromisso entre a rapidez com que se atinge o equilíbrio e a limitação da formação de microgotículas de 1-octanol.

▼M4

Colheita e tratamento das amostras

43. Antes da colheita das amostras, deve desligar-se o agitador e esperar-se que os líquidos se imobilizem. Depois de colhidas as amostras, volta a pôr-se o agitador lentamente em movimento, conforme descrito acima, aumentando-se gradualmente a velocidade de agitação.

44. Colhem-se as amostras da fase aquosa à saída da torneira existente no fundo do recipiente de reação. Rejeitar sempre o volume morto de água retido na torneira (cerca de 5 ml no recipiente ilustrado no apêndice 2); a água retida na torneira não é agitada e, portanto, não se encontra em equilíbrio com o resto do líquido. Registar o volume das amostras de água e não esquecer que a quantidade de substância em estudo presente na água rejeitada deve ser tida em conta no balanço de massas. Para minimizar as perdas por evaporação, deve verter-se cuidadosamente a água na ampola de decantação, de modo a não perturbar a interface água/1-octanol.

45. Constituem-se amostras de 1-octanol retirando uma pequena alíquota (cerca de 100 µl) da fase de 1-octanol, com uma seringa de vidro e metal de 100 microlitros. Devem tomar-se as precauções necessárias para não perturbar a interface. Registar o volume das amostras. É suficiente uma alíquota de pequeno volume, pois a amostra de 1-octanol vai ser diluída.

46. Devem evitar-se transferências desnecessárias das amostras. Para isso, deve determinar-se gravimetricamente o volume das amostras. No caso das amostras de água, poderá recolher-se cada amostra numa ampola de decantação que contenha já o volume de solvente necessário.

DADOS E RELATÓRIOS

47. Este método de ensaio prevê a determinação do coeficiente de partição 1--octanol/água (P_{OW}) com base em três ensaios com agitação lenta (três unidades experimentais), em condições idênticas, do composto em estudo. A correspondência utilizada para demonstrar que o equilíbrio foi atingido deve basear-se nos resultados de, pelo menos, quatro determinações de C_O/C_W em momentos consecutivos de colheita de amostras. Pode, assim, calcular-se a variância, como medida da incerteza do valor médio obtido em cada unidade experimental.

48. Pode caracterizar-se o valor de P_{OW} pela variância dos resultados obtidos em cada unidade experimental. Utiliza-se esta informação para calcular o P_{OW} como média ponderada dos resultados obtidos em cada uma das unidades. Para isso, utiliza-se como fator de ponderação o inverso da variância dos resultados de cada unidade experimental. Consequentemente, os dados com maior variação (expressa pela variância) e, portanto, menos fiáveis têm menos influência no resultado final do que os dados com menor variância.

49. Calcula-se também, de modo análogo, um desvio-padrão ponderado. Este parâmetro caracteriza a repetibilidade da medição do P_{OW}. Um valor baixo de desvio-padrão ponderado indica uma repetibilidade elevada da determinação de P_{OW} num laboratório. Resume-se a seguir o tratamento estatístico formal dos dados.

▼M4

Tratamento dos resultados

Demonstração de que se atingiu o equilíbrio

50. Calcula-se, para cada momento de colheita de amostras, o logaritmo da razão entre a concentração da substância em estudo em 1-octanol e em água [log (C_O/C_W)]. Comprova-se se o equilíbrio foi atingido representado graficamente essa razão em função do tempo. Se, nessa representação, for definido um patamar que abranja pelo menos quatro momentos consecutivos de colheita de amostras, o equilíbrio terá sido atingido e o composto estará verdadeiramente dissolvido no 1-octanol. Caso contrário, será necessário prosseguir o ensaio, até que quatro pontos consecutivos de colheita de amostras gerem um declive não significativamente diferente de zero, para p = 0,05, indicando assim que o parâmetro log (C_O/C_W) é independente do tempo.

Cálculo de log P_{OW}

51. O valor de log P_{OW} de cada unidade experimental corresponde ao valor médio ponderado de log (C_O/C_W) referente à parte da curva de log (C_O/C_W) em função do tempo na qual o equilíbrio foi comprovadamente atingido. Calcula-se essa média ponderando os dados com o inverso da variância, de modo que a influência dos dados no resultado final seja inversamente proporcional à incerteza dos mesmos.

Valor médio de log P_{OW}

52. O valor médio do log P_{OW} de várias unidades experimentais corresponde à média dos resultados dessas unidades, ponderados com a variância da unidade respetiva.

O cálculo a efetuar é o seguinte:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

em que:

$\log P_{OW,i}$ = valor do log P_{OW} da unidade experimental i;

$\log P_{OW,Av}$ = valor médio ponderado das determinações de log P_{OW};

w_i = ponderação estatística do valor de log P_{OW} correspondente à unidade experimental i.

Como w_i utiliza-se o inverso da variância de log $P_{OW,i}$ [$w_i = (\text{var} \log P_{OW,i}^{-1})$].

53. Como estimativa do erro do valor médio de log P_{OW} utiliza-se a repetibilidade do log (C_O/C_W) determinado para a fase de equilíbrio de cada unidade experimental. Exprime-se esse erro como o desvio-padrão ponderado de log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$), o qual mede o erro associado a log $P_{OW,Av}$. O desvio-padrão ponderado pode calcular-se do seguinte modo, a partir da variância ponderada

$$\text{var}_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (\text{var}_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

O símbolo "n" corresponde ao número de unidades experimentais.

▼M4

Relatório dos ensaios

54. Elementos a constar do relatório dos ensaios:

Substância em estudo:

— nome comum, denominação química, número CAS, fórmula estrutural (indicando a posição marcada marcada com isótopos radioativos, se for esse o caso) e propriedades físico-químicas pertinentes (ver o ponto 17),

— grau de pureza da substância (presença de impurezas),

— grau de pureza radioquímica da substância marcada e atividade molar (se for caso disso),

— estimativa preliminar de log P_{OW} e método de cálculo utilizado para determinar esse valor.

Condições de realização do ensaio:

— datas da realização dos estudos,

— temperatura durante os ensaios,

— volumes de 1-octanol e de água no início de cada ensaio,

— volumes das amostras de 1-octanol e de água colhidas,

— volumes de 1-octanol e de água que permanecem nos recipientes de ensaio,

— descrição dos recipientes de ensaio e das condições de agitação utilizados (geometria da barra de agitação e do recipiente de ensaio, altura do vórtice, em milímetros, e, quando conhecida, velocidade de agitação),

— métodos de análise utilizados para determinar a substância em estudo e limite de quantificação dos mesmos,

— cronologia das colheitas de amostras,

— pH da fase aquosa e tampões utilizados, quando se regula o pH devido à presença de moléculas ionizáveis,

— número de replicados.

Resultados:

— repetibilidade e sensibilidade dos métodos de análise utilizados,

— concentrações determinadas da substância em estudo no 1-octanol e na água, em função do tempo,

— balanço de massas,

— temperatura e desvio-padrão da temperatura, ou intervalo de temperaturas, durante o ensaio,

— gráfico da razão das concentrações em função do tempo,

— valor médio log $P_{OW,Av}$ e erro-padrão do mesmo,

— discussão e interpretação dos resultados,

▼M4

— exemplos de dados não tratados de análises representativas (os dados não tratados devem ser todos registados de acordo com as boas práticas de laboratório), incluindo recuperações de padrões paralelos, número de níveis de concentração utilizado na calibração (juntamente com os critérios do coeficiente de correlação da curva de calibração) e resultados de controlo/garantia de qualidade,

— caso exista: relatório da validação do protocolo experimental (a mencionar nas referências).

REFERÊNCIAS:

(1) De Bruijn J.H.M., Busser F., Seinen W., Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the "slow-stirring" method. *Environ. Toxicol. Chem.* 8:499-512.

(2) Capítulo A.8 deste anexo, "Coeficiente de partição".

(3) Capítulo A.8 deste anexo, "Coeficiente de partição".

(4) OCDE (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122, Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

(5) Tolls J. (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling R.S., Mackay D. (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.

(7) Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M. (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

(8) Arnold C.G., Widenhaupt A., David M.M., Müller S.R., Haderlein S.B., Schwarzenbach R.P. (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31:2596-2602.

(9) OCDE (1981). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112, Dissociation Constants in Water. Paris.

(10) Capítulo A.6 deste anexo, "Solubilidade em água".

(11) Capítulo C.7 deste anexo, "Degradação – Degradação abiótica: Hidrólise em função do pH".

(12) Capítulo C.4, "Determinação da biodegradabilidade 'Fácil'", partes II a VII (métodos A a F), deste anexo.

(13) Capítulo A.4 deste anexo, "Pressão de vapor".

(14) Pinsuwan S., Li A., Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients. *J. Chem. Eng. Data* 40:623-626.

(15) Lyman W.J. (1990). Solubility in water. *In*: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds. Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H. Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 a 2-52.

(16) Leo A., Weininger D. (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan W. (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L. (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd., Budapest.

(19) ACD. ACD logP. Advanced Chemistry Development, Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman W.J. (1990). Octanol/water partition coefficient. *In* Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., eds., Handbook of chemical property estimation. American Chemical Society, Washington, D.C.

(21) Rekker R.F., de Kort H.M. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14:479-488.

(22) Jübermann O. (1958). Houben-Weyl, ed., *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

Apêndice 1

Tabela para o cálculo do volume mínimo de água necessário para a deteção, em fases aquosas, de substâncias em estudo com diferentes valores de log P_{OW}

Pressupostos:

— Volume máximo de cada alíquota = 10 % do volume total; 5 alíquotas = 50 % do volume total.

— Concentração da substância em estudo = $0,7 \times$ solubilidade em cada fase. Se a concentração for mais baixa, serão necessários volumes maiores.

— Volume utilizado para determinar o limite de deteção (LOD) = 100 ml.

— As relações log P_{OW} em função de log S_W e log P_{OW} em função de SR (solubilidade relativa, S_O/S_W) traduzem com razoabilidade relações evidenciadas pelas substâncias às quais o método se aplica.

Estimativa de S_W

log P_{OW}	Equação	log S_W	S_W (mg/l)
4	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 0,887	1,297E-01
6	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 1,809	1,552E-02
7	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 2,731	1,858E-03
8	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 3,192	6,427E-04

Estimativa de S_O

log P_{OW}	Equação	S_O (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,49$	2,710E+05

▼**M4**

Massa total da substância em estudo (mg)	$Massa_{octanol}$/ $Massa_{água}$	$Massa_{água}$ (mg)	$Concentração_{água}$ (mg/l)	$Massa_{octanol}$ (mg)	$Concentração_{octanol}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Cálculo dos volumes

Volume mínimo da fase aquosa, em função do limite de deteção (LOD)

log K_{OW}	LOD (microgramas/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volume utilizado na determinação do LOD (l)	0,1					

Legenda

Representa menos de 10 % do volume total de fase aquosa, com um recipiente de equilíbrio de um litro.

Representa menos de 10 % do volume total de fase aquosa, com um recipiente de equilíbrio de dois litros.

Representa menos de 10 % do volume total de fase aquosa, com um recipiente de equilíbrio de cinco litros.

Representa menos de 10 % do volume total de fase aquosa, com um recipiente de equilíbrio de 10 litros.

Excede 10 % do volume até do recipiente de equilíbrio de 10 litros.

▼M4

Resumo dos volumes necessários, em função da hidrossolubilidade e do log P_{OW}

Volume mínimo (ml) da fase aquosa, em função do limite de deteção (LOD)

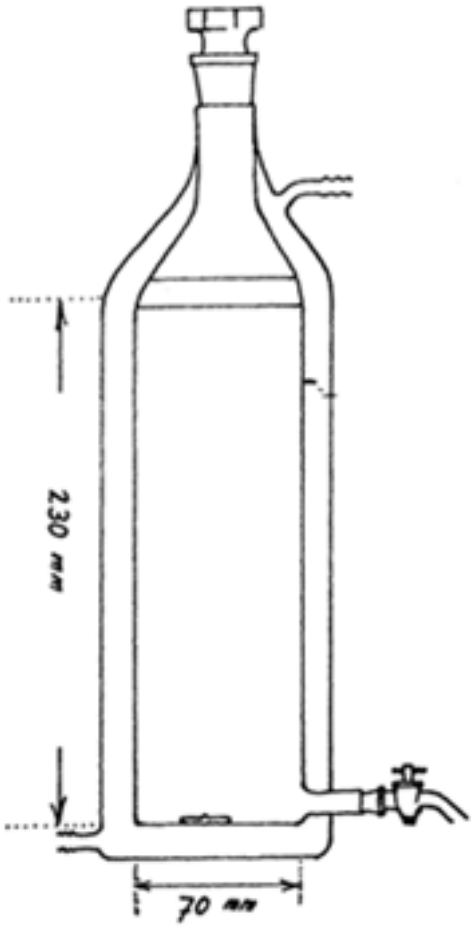
log P_{OW}	S_W (mg/l)	LOD (microgramas/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

▼M4

log P_{OW}	S_W (mg/l)	LOD (microgramas/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volume utilizado na determinação do LOD (l)		0,1					

Apêndice 2

Exemplo de recipiente com camisa de vidro para o ensaio com agitação lenta, para determinação do P_{OW}



▼B

PARTE B: MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE E DE OUTROS EFEITOS NA SAÚDE

ÍNDICE

	INTRODUÇÃO GERAL
B.1.bis.	TOXICIDADE ORAL AGUDA — PROCEDIMENTO DE DOSE FIXA
B.1.tris.	TOXICIDADE ORAL AGUDA — MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA
B.2.	TOXICIDADE AGUDA POR INALAÇÃO
B.3.	TOXICIDADE AGUDA (DÉRMICA)
B.4.	TOXICIDADE AGUDA: IRRITAÇÃO/CORROSÃO DÉRMICA
B.5.	TOXICIDADE AGUDA: IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR
B.6.	SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA
B.7.	ESTUDO DA TOXICIDADE ORAL POR DOSE REPETIDA DURANTE 28 DIAS EM ROEDORES
B.8.	TOXICIDADE SUBAGUDA POR INALAÇÃO: ESTUDO DE 28 DIAS
B.9.	TOXICIDADE (DÉRMICA) DA DOSE REPETIDA (28 DIAS)
B.10.	MUTAGENICIDADE — ENSAIO *IN VITRO* DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM MAMÍFEROS
B.11.	MUTAGENICIDADE — ENSAIO *IN VIVO* DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM CÉLULAS DA MEDULA DE MAMÍFEROS
B.12.	MUTAGENICIDADE — ENSAIO *IN VIVO* DOS MICRONÚCLEOS EM ERITRÓCITOS DE MAMÍFEROS
B.13/14.	MUTAGENICIDADE — ENSAIO DE MUTAÇÃO REVERSA EM BACTÉRIAS
B.15.	TESTES DE MUTAGÉNESE E DESPISTE DE CARCINOGÉNESE MUTAÇÃO GÉNICA — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
B.16.	RECOMBINAÇÃO MITÓTICA — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
B.17.	MUTAGENICIDADE — ENSAIO DE MUTAÇÃO GÉNICA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS *IN VITRO*
B.18.	LESÃO E REPARAÇÃO DO ADN — SÍNTESE NÃO PROGRAMADA — CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*
B.19.	TESTE *IN VITRO* DE TROCA ENTRE CROMÁTIDES DO MESMO CROMOSSOMA
B.20.	TESTE DE LETALIDADE RECESSIVA LIGADA AO SEXO NA *DROSOPHILA MELANOGASTER*

▼B

B.21. TESTES DE TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

B.22. TESTE DE LETALIDADE DOMINANTE NO ROEDOR

B.23. ENSAIO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM ESPERMATOGÓNIAS DE MAMÍFERO

B.24. TESTE DAS MALHAS (*SPOT-TEST*) NO RATINHO

B.25. TRANSLOCAÇÃO HEREDITÁRIA NO RATINHO

B.26. ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL SUBCRÓNICA ESTUDO DE TOXICIDADE ORAL DE DOSE REPETIDA EM ROEDORES COM A DURAÇÃO DE 90 DIAS

B.27. ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL SUBCRÓNICA ESTUDO DE TOXICIDADE ORAL DE DOSE REPETIDA EM ESPÉCIES NÃO ROEDORAS COM A DURAÇÃO DE 90 DIAS

B.28. TOXICIDADE DÉRMICA SUBCRÓNICA: TESTE DE DOSE REPETIDA POR VIA DÉRMICA, A NOVENTA DIAS, EM ROEDORES

B.29. TOXICIDADE SUBCRÓNICA POR INALAÇÃO: ESTUDO DE 90 DIAS

B.30. ESTUDOS DE TOXICIDADE CRÓNICA

B.31. ESTUDO DE TOXICIDADE SOBRE O DESENVOLVIMENTO PRÉ-NATAL

B.32. ESTUDOS DE CARCINOGENICIDADE

B.33. ESTUDOS COMBINADOS DE TOXICIDADE CRÓNICA E CARCINOGENICIDADE

B.34. TESTE DE TOXICIDADE SOBRE A REPRODUÇÃO EM UMA GERAÇÃO

B.35. ESTUDO DE TOXICIDADE SOBRE A REPRODUÇÃO EM DUAS GERAÇÕES

B.36. TOXICOCINÉTICA

B.37. NEUROTOXICIDADE RETARDADA DE SUBSTÂNCIAS ORGANOFOSFORADAS POR EXPOSIÇÃO AGUDA

B.38. NEUROTOXICIDADE RETARDADA DE SUBSTÂNCIAS ORGANOFOSFORADAS POR ADMINISTRAÇÃO REPETIDA A 28 DIAS

B.39. ENSAIO *IN VIVO* DA SÍNTESE NÃO PROGRAMADA (UDS) DE ADN EM CÉLULAS DO FÍGADO DE MAMÍFEROS

B.40. CORROSÃO DA PELE *IN VITRO*: ENSAIO DA RESISTÊNCIA ELÉCTRICA TRANSCUTÂNEA (RET)

B.40.A. CORROSÃO DA PELE *IN VITRO*: ENSAIO EM MODELOS DE PELE HUMANA

▼**B**

B.41. ENSAIO DE FOTOTOXICIDADE *IN VITRO* 3T3 NRU

B.42. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA: ENSAIO DE GÂNGLIOS LINFÁTICOS LOCAIS

B.43. ESTUDO DE NEUROTOXICIDADE EM ROEDORES

B.44. ABSORÇÃO CUTÂNEA: MÉTODO *IN VIVO*

B.45. ABSORÇÃO CUTÂNEA: MÉTODO *IN VITRO*

B.46. IRRITAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAIO EM EPIDERME HUMANA RECONSTRUÍDA

B.47. MÉTODO DE ENSAIO DE OPACIDADE E PERMEABILIDADE DA CÓRNEA EM BOVINOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUE PRODUZAM CORROSÃO OU FORTE IRRITAÇÃO OCULAR

B.48. MÉTODO DE ENSAIO EM OLHOS DE FRANGO ISOLADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUE PRODUZAM CORROSÃO OU FORTE IRRITAÇÃO OCULAR

B.49. ENSAIO *IN VITRO* DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

B.50. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA: ENSAIO DE GÂNGLIOS LINFÁTICOS LOCAIS: DA

B.51. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA: ENSAIO DE GÂNGLIOS LINFÁTICOS LOCAIS: BRDU-ELISA

▼**M4**

B.52. TOXICIDADE AGUDA POR INALAÇÃO — MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA

▼B

INTRODUÇÃO GERAL

A. CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

Antes de iniciar qualquer estudo de toxicidade devem conhecer-se a composição da substância em estudo, incluindo as principais impurezas que contenha, e as propriedades físico-químicas mais importantes, nomeadamente a estabilidade.

As propriedades físico-químicas da substância fornecem informações de relevo para a escolha da via de administração e a concepção de cada estudo específico, bem como para o manuseamento e a armazenagem da substância.

O estudo deve ser precedido do desenvolvimento de um método analítico para a determinação qualitativa e quantitativa da substância em estudo (incluindo, sempre que possível, as principais impurezas) no meio de administração e no material biológico.

Devem incluir-se no relatório de ensaio todas as informações disponíveis referentes à identificação, às propriedades físico-químicas, à pureza e ao comportamento da substância em estudo.

B. CUIDADOS COM OS ANIMAIS

Nos estudos de toxicidade é fundamental efectuar um controlo estrito das condições ambientais e utilizar técnicas adequadas para o cuidado dos animais.

i) *Condições de alojamento*

As condições ambientais nos locais ou recintos destinados aos animais devem ser adequadas às espécies em estudo. Para ratos, ratinhos e cobaias, a temperatura do local deve ser de 22 ºC ± 3 ºC e a humidade relativa de 30 % a 70 %; no que respeita aos coelhos, a temperatura ambiente deve ser de 20 ºC ± 3 ºC e a humidade relativa de 30 % a 70 %.

Algumas técnicas experimentais são particularmente sensíveis aos efeitos da temperatura; em tais casos, a descrição do método de ensaio deve incluir pormenores relativos às condições adequadas. Em todos os ensaios de toxicidade, a temperatura e humidade devem ser controladas, registadas e referidas no relatório final.

A iluminação deve ser artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de obscuridade. Os pormenores relativos à iluminação devem ser registados e incluídos no relatório final.

Salvo especificação em contrário, os animais devem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo. Em caso de alojamento colectivo, não devem colocar-se mais de 5 animais numa gaiola.

Nos relatórios de experiências com animais, é conveniente indicar o tipo de gaiolas utilizadas e o número de animais alojados em cada gaiola, tanto durante o período de exposição à substância em estudo como durante o eventual período de observação subsequente.

▼B

ii) *Condições de alimentação*

A dieta deve satisfazer todos os requisitos nutricionais da espécie em estudo. No caso de as substâncias serem administradas aos animais na respectiva dieta, o valor nutricional da mesma pode ser reduzido pela interacção entre a substância e determinados constituintes da dieta. Essa possibilidade deve ser tida em conta na interpretação dos resultados dos ensaios. Podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório, com um fornecimento ilimitado de água para beber. A escolha da dieta pode ser condicionada pela necessidade de assegurar a administração adequada da substância em estudo, caso se recorra a esta via.

Os eventuais contaminantes que influenciem a toxicidade não devem estar presentes em concentrações que possam interferir com os resultados.

C. **ENSAIOS ALTERNATIVOS**

A União Europeia está empenhada em promover a elaboração e validação de técnicas alternativas que forneçam a mesma quantidade de informações que os ensaios actuais em animais, mas que utilizem um número inferior de animais, lhes causem menor sofrimento ou evitem, de todo, o recurso aos mesmos.

Na caracterização dos riscos e consequente classificação e rotulagem dos produtos e para a avaliação da segurança química devem utilizar-se, sempre que possível, métodos deste tipo, à medida que se encontrem disponíveis.

D. **AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO**

Aquando da avaliação e interpretação dos ensaios devem ter-se em conta as limitações apresentadas pela extrapolação directa para o homem dos resultados obtidos em estudos com animais e *in vitro,* pelo que, para a confirmação dos referidos resultados, devem utilizar-se, sempre que se encontrem disponíveis, dados referentes a efeitos adversos no homem.

E. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

A maioria dos métodos apresentados foram elaborados no âmbito do programa da OCDE das directrizes em matéria de ensaios, devendo os mesmos ser executados em conformidade com as boas práticas de laboratório, de modo a garantir, na medida do possível, o reconhecimento mútuo dos resultados.

Podem obter-se informações adicionais nas referências incluídas nas directrizes da OCDE, bem como em outras publicações no domínio em causa.

▼B

B.1.bis. **TOXICIDADE ORAL AGUDA — PROCEDIMENTO DE DOSE FIXA**

1. **MÉTODO**

O presente método é equivalente ao «Test Guideline» TG 420 da OCDE (2001).

1.1. INTRODUÇÃO

Os métodos tradicionais de avaliação de toxicidade aguda utilizam a morte dos animais como critério específico. Em 1984, foi sugerida pela British Toxicology Society uma nova abordagem ao ensaio da toxicidade aguda com base na administração de uma série de doses fixas (1). Esta abordagem evitava a utilização da morte dos animais como um critério específico. O novo método baseava-se na observação de sinais evidentes de toxicidade ocorrentes a determinado valor de uma série de doses fixas. Em 1992 e no seguimento dos estudos de validação *in vivo* efectuados tanto no Reino Unido (2) como internacionalmente (3), o procedimento foi adoptado como método de ensaio. Subsequentemente, as propriedades estatísticas do Procedimento de Dose Fixa foram avaliadas em vários estudos utilizando modelos matemáticos (4)(5)(6). Em conjunto, os estudos *in vivo* e de modelação mostraram que o procedimento é reprodutível, utiliza um menor número de animais e causa menor sofrimento do que os métodos tradicionais, permitindo classificar as substâncias de um modo semelhante a outros métodos de ensaio de toxicidade aguda.

No Documento de Orientação sobre Ensaios de Toxicidade Oral Aguda (7) podem consultar-se as orientações sobre a selecção do método de ensaio mais apropriado a determinado fim. Este Documento de Orientação contém igualmente informação adicional sobre o procedimento e interpretação do Método de Ensaio B.1.

Um dos princípios básicos do presente método consiste na utilização de doses moderadamente tóxicas no estudo principal, evitando a administração de doses previsivelmente letais. Além disso, não é necessário administrar doses para as quais se sabe previamente que causam dor e sofrimento óbvios, devido à sua acção corrosiva ou fortemente irritante. Os animais moribundos ou os animais que apresentam sinais óbvios de dor ou sofrimento grave e continuado devem ser sacrificados sem dor e, na interpretação dos resultados do ensaio, devem ser considerados do mesmo modo que os animais que morrem durante o ensaio. Os critérios sobre a decisão de sacrificar animais moribundos ou em sofrimento grave, bem como as orientações sobre a identificação de morte previsível ou iminente, estão incluídos separadamente num Documento de Orientação (8).

O presente método permite obter informação sobre a perigosidade e possibilita a graduação e classificação da substância em conformidade com o Sistema Harmonizado ao Nível Mundial (GHS) para a classificação de substâncias químicas que causam toxicidade aguda (9).

Antes de efectuar o estudo, o laboratório de ensaio deve ter em conta toda a informação disponível sobre a substância de ensaio. Esta informação incluirá a identificação e a estrutura química da substância, as suas propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros ensaios de toxicidade da substância *in vitro* ou *in vivo,* dados toxicológicos sobre substâncias estruturalmente semelhantes e a(s) utilização(ões) prevista(s) para a substância. Esta informação é necessária para satisfazer todos os envolvidos em relação à relevância do ensaio ao nível da protecção da saúde humana e será útil na determinação de uma dose inicial apropriada.

▼B

1.2. DEFINIÇÕES

Toxicidade oral aguda: refere-se ao conjunto de efeitos adversos que se manifestam após a administração oral de uma dose única da substância ou de várias doses num período de 24 horas.

Morte retardada: significa que o animal não morre nem aparenta estar moribundo num período de 48 horas, mas morre mais tarde, no decorrer do período de observação de 14 dias.

Dose: quantidade aplicada da substância de ensaio. O valor da dose é expresso em peso de substância de ensaio por unidade de peso do animal (mg/kg).

Toxicidade evidente: termo geral que descreve a ocorrência de sinais óbvios de toxicidade na sequência da administração da substância de ensaio [consultar os exemplos descritos em (3)] no qual a dose fixa mais elevada seguinte pode induzir, na maior parte dos animais, dor intensa, sinais persistentes de distúrbios graves, estado moribundo (os respectivos critérios são apresentados no Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (8) ou, provavelmente, mortalidade.

GHS: Sistema Harmonizado ao Nível Mundial (Globally Harmonised System) para a Classificação de Substâncias Químicas e Misturas. Trata-se de um trabalho conjunto da OCDE (saúde humana e ambiente), do Comité de Peritos em Transporte de Mercadorias Perigosas das Nações Unidas (propriedades físico-químicas) e da OIT (notificação de perigos) e coordenado pelo Programa Interorganizações para a Boa Gestão das Substâncias Químicas [Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC)].

Morte iminente: situação em que se prevê a ocorrência de estado moribundo ou morte antes da próxima observação planeada. Alguns dos sinais indicativos deste estado em roedores incluem convulsões, posição lateral, posição deitada e tremores. [Consultar o Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (8) para mais detalhes.]

DL_{50} (Dose Letal Média): dose única, calculada estatisticamente, de uma substância susceptível de causar a morte de 50 % dos animais quando administrada por via oral. O valor da DL_{50} é expresso em peso, de substância de ensaio, por unidade de peso do animal de ensaio (mg/kg).

Teste-limite: refere-se a uma dose com o valor limite superior admitido pelo ensaio (2 000 ou 5 000 mg/kg).

Estado moribundo: encontrar-se num estado de morte ou de incapacidade de sobrevivência, mesmo com tratamento. [Consultar o Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (8) para mais detalhes.]

Morte previsível: presença de sinais clínicos indicativos de ocorrência de morte em determinada altura (antes do final planeado da experiência, por exemplo): incapacidade de alcançar água ou comida. [Consultar o Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (8) para mais detalhes.]

▼B

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

São administradas doses gradualmente crescentes a grupos de animais do mesmo sexo, usando as doses fixas de 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg (excepcionalmente pode utilizar-se uma dose fixa adicional de 5 000 mg/kg; consultar a secção 1.6.2). A dose inicial é escolhida com base num estudo preliminar de determinação de amplitude como a dose para qual é previsível obter alguns sinais de toxicidade sem causar efeitos tóxicos graves ou mortalidade. Os sinais clínicos e as condições associadas com dor, sofrimento e morte iminente, são descritos detalhadamente num Documento de Orientações da OCDE separado (8). Outros grupos de animais poderão ser sujeitos a dosagens, com doses fixas superiores ou inferiores, consoante a presença ou ausência de sinais de toxicidade ou mortalidade. Repete-se este procedimento até identificação da dose que causa toxicidade evidente ou que provoque uma e apenas uma morte ou até à dose mais elevada no caso de não serem observados quaisquer efeitos. O procedimento é imediatamente interrompido no caso de se registarem mortes à dose mais baixa.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Selecção de espécies animais**

A espécie preferida para ensaio é o rato, mas podem ser utilizadas outras espécies de roedores. Normalmente, utilizam-se fêmeas (7). Tal escolha deve-se ao facto de uma análise da literatura científica relativa aos ensaios convencionais de DL_{50} revelar que, habitualmente, a diferença de sensibilidade entre os sexos é pequena e, nos casos em que são observadas diferenças, as fêmeas são, de um modo geral, ligeiramente mais sensíveis (10). No entanto, devem utilizar-se machos caso as propriedades toxicológicas ou tóxico-cinéticas descritas para substâncias químicas estruturalmente semelhantes indicarem que estes podem revelar maior sensibilidade. Quando o ensaio é efectuado com machos, deve ser apresentada uma justificação adequada.

Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis e pertencentes a estirpes laboratoriais de uso corrente. As fêmeas devem ser nulíparas e não grávidas. No início da administração das doses, todos os animais devem ter idades compreendidas entre as 8 e as 12 semanas e um peso compreendido no intervalo de ± 20 % do peso médio dos animais aos quais foram anteriormente administradas doses.

1.4.2. **Condições de alojamento e alimentação**

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser de 22 ºC (± 3ºC). A humidade relativa deverá ser 50-60 %, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30 % e um máximo que, de preferência, não deverá exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A alimentação pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber. Os animais aos quais é administrada a mesma dose, podem ser agrupados na mesma gaiola desde que, o número de animais em cada gaiola não impeça a observação clara de cada um deles.

1.4.3. **Preparação dos animais**

Os animais são escolhidos ao acaso, marcados de modo a permitir uma identificação individualizada e mantidos nas suas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início da administração das doses de modo a permitir que se aclimatem às condições laboratoriais.

▼B

1.4.4. **Preparação das doses**

De um modo geral, as substâncias de ensaio devem ser administradas num volume constante ao longo de toda a gama de doses a ensaiar através da variação da concentração na preparação da dose. No entanto, para o caso do ensaio de um produto ou de uma mistura no estado líquido, pode ser mais relevante para a avaliação de risco subsequente a utilização da substância de ensaio sem qualquer diluição, ou seja, a concentração constante, sendo este um requisito apresentado por algumas autoridades competentes. Em qualquer dos casos, não deve ser excedido o volume máximo da dose a ser administrada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal de ensaio. No caso de roedores, em condições normais o volume não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal. Para soluções aquosas, contudo, pode ser considerada a dose de 2 ml/100 g de peso corporal. Recomenda-se que, sempre que possível, seja considerada em primeiro lugar a utilização de uma solução/suspensão/emulsão aquosa; caso tal não seja viável, pode considerar-se o uso de uma solução/suspensão/-emulsão em óleo (por exemplo, óleo de milho); em última instância, poderá eventualmente recorrer-se ao uso de soluções noutros excipientes. Devem conhecer-se as características tóxicas dos excipientes que não sejam a água. As doses devem ser preparadas pouco tempo antes da sua administração, a menos que a estabilidade da preparação ao longo do período de utilização seja conhecida e tenha sido considerada aceitável.

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. **Administração de doses**

A administração deve ser feita numa toma única, por sonda esofágica, usando tubo estomacal ou cânula de intubação apropriada. Nos casos raros em que não é possível a administração de uma toma única, a dose pode ser administrada em fracções menores ao longo de um período não superior a 24 horas.

Os animais devem ser sujeitos a jejum antes da administração das doses (por exemplo, no caso de ratos, não deve dar-se comida durante a noite, mas deve manter-se o fornecimento de água; no caso de ratinhos, a comida deve ser suspensa durante 3-4 horas e deve ser mantido o fornecimento de água). Após o período de jejum, os animais devem ser pesados e deve ser administrada a substância de ensaio. Após a administração da substância, pode evitar dar-se comida durante 3-4 horas para ratos e 1-2 horas para ratinhos. Nos casos de administração fraccionada da dose durante um certo lapso de tempo, pode ser necessário dar comida e água aos animais consoante a duração do período de administração.

1.5.2. **Estudo de determinação de amplitude**

O objectivo do estudo de determinação de amplitude consiste em seleccionar a dose inicial apropriada para o estudo principal. A substância de ensaio é administrada a um único animal de uma forma sequencial segundo os fluxogramas do anexo 1. O estudo de determinação de amplitude termina quando se pode seleccionar a dose inicial para o estudo principal (ou se for registada uma morte à dose fixa mais baixa).

Para o estudo de determinação de amplitude, a dose inicial é seleccionada de entre as doses fixas de 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg, como sendo a dose que se prevê poder causar toxicidade evidente com base, se possível, nas evidências de dados *in vivo* e *in vitro* da mesma substância química ou de substâncias químicas estruturalmente semelhantes. Na ausência de tal informação, a dose inicial será de 300 mg/kg.

O intervalo de aplicação de doses a cada animal será de, pelo menos, 24 horas. Todos os animais devem ser observados durante um período de, pelo menos, 14 dias.

▼B

Excepcionalmente e apenas quando justificado por necessidades regulamentares específicas, pode ser considerada a utilização de uma dose fixa superior adicional de 5 000 mg/kg (consultar o Anexo 3). Por razões de protecção dos animais, é desencorajado o ensaio de animais na Categoria 5 do SHG (2 000-5 000 mg/kg). Esta dose só deve ser considerada quando existe uma elevada probabilidade dos resultados deste ensaio terem relevância directa na protecção dos animais, da saúde humana ou do ambiente.

Nos casos em que o animal de ensaio morre no estudo de determinação de amplitude quando se aplica a dose fixa mais baixa (5 mg/kg), o procedimento normal consiste em terminar o estudo e classificar a substância na Categoria 1 do GHS (tal como se indica no Anexo 1). No entanto, se for necessária uma confirmação adicional, pode ser efectuado um procedimento experimental suplementar, tal como se descreve seguidamente. Aplica-se uma dose de 5 mg/kg a um segundo animal. Se o segundo animal morrer confirma-se a Categoria 1 do GHS e o estudo é imediatamente terminado. Se o segundo animal sobreviver, será então administrada a dose de 5 mg/kg a um máximo de mais três animais. Dado que neste caso o risco de mortalidade é elevado, a administração das doses a estes animais deve ser feita de um modo sequencial, de modo a proteger os animais. O intervalo, entre a aplicação da dose a cada um dos animais, deve ser suficiente para assegurar a provável sobrevivência do animal anterior. Se ocorrer uma segunda morte, a sequência de aplicação da dose será terminada imediatamente e não serão ensaiados mais animais. Dado que, a ocorrência de uma segunda morte (independentemente do número de animais ensaiados até ao final do estudo) é classificável no resultado A (duas ou mais mortes), segue-se a regra de classificação do Anexo 2 para a dose fixa de 5 mg/kg (Categoria 1, se ocorrerem duas ou mais mortes, ou Categoria 2, se não ocorrer mais do que uma morte). Além disso, apresentam-se no Anexo 4 as orientações sobre a classificação segundo o sistema da UE, válido até à implementação do novo GHS.

1.5.3. **Estudo principal**

1.5.3.1. *Número de animais e doses*

No Anexo 2 apresentam-se os procedimentos a seguir após o ensaio com a dose inicial. É necessário proceder de uma das três formas seguintes: terminar os ensaios e classificar a substância na classe de perigosidade apropriada, prosseguir os ensaios como uma dose fixa superior, ou prosseguir os ensaios com uma dose fixa inferior. No entanto, por uma questão de protecção dos animais, a dose que causou morte, no estudo de determinação de amplitude, não deve ser repetida no estudo principal (consultar Anexo 2). A experiência prévia é indicativa de que o resultado mais provável da dose inicial será a possibilidade de classificação da substância, o que toma desnecessários quaisquer ensaios adicionais.

Será normalmente utilizado um total de cinco animais do mesmo sexo para cada dose investigada. O grupo de cinco animais será constituído por um animal do estudo prévio, ao qual foi administrada a dose seleccionada e de quatro outros animais (excepto, em casos raros, se a dose utilizada no estudo principal não tiver sido incluída no estudo de determinação de amplitude).

O intervalo de tempo entre a aplicação de doses em cada nível é determinado pelo aparecimento, duração e gravidade dos sinais de toxicidade. O tratamento dos animais com a dose seguinte deve ser adiado até ser possível estabelecer com segurança a sobrevivência dos animais previamente tratados. Recomenda-se um período de 3 ou 4 dias entre a administração das doses para cada nível de dosagem, se necessário, de modo a permitir a detecção de efeitos tóxicos retardados. O intervalo de tempo pode ser ajustado se necessário, por exemplo, em caso de resposta inconclusiva.

▼B

No caso de se considerar a utilização da dose fixa máxima de 5 000 mg/kg, deve proceder-se em conformidade com o procedimento descrito no Anexo 3. (Consultar igualmente a secção 1.6.2.)

1.5.3.2. *Teste-limite*

O teste-limite é utilizado, essencialmente, em situações nas quais o analista tem informação indicativa de o material de ensaio não ser provavelmente tóxico, ou seja, só apresenta toxicidade acima das doses-limite regulamentadas. A informação sobre a toxicidade do material de ensaio pode ser obtida a partir de ensaios em compostos semelhantes ou de ensaios de misturas ou produtos semelhantes, tendo em consideração a identificação e percentagem dos componentes cuja relevância toxicológica é conhecida. Nos casos em que a informação sobre a toxicidade do material de ensaio é limitada ou inexistente, ou nos casos em que é previsível que o material a ensaiar seja tóxico, deve ser efectuado o estudo principal.

Usando o procedimento normal para este ensaio, o teste-limite pode ser efectuado graças a um estudo de determinação de amplitude com uma dose inicial de 2 000 mg/kg (ou, excepcionalmente, de 5 000 mg/kg), seguido da administração da dose a mais quatro animais.

1.6. OBSERVAÇÕES

Após a aplicação da dose, os animais devem ser observados individualmente pelo menos uma vez durante os primeiros 30 minutos e periodicamente durante as primeiras 24 horas, com especial cuidado nas primeiras quatro horas. Seguidamente, é necessário observar os animais diariamente durante um período de 14 dias, excepto se for necessário retirá-los do estudo e sacrificá-los, sem dor, por motivo do bem-estar dos animais, ou se forem encontrados mortos. No entanto, a duração do período de observação não deve ser estabelecida de uma forma rígida, mas determinada com base nas reacções de toxicidade, velocidade do seu aparecimento e duração do período de recuperação, que pode ser prolongado, se for considerado necessário. O momento em que os sinais de toxicidade aparecem e desaparecem são importantes, sobretudo se os sinais de toxicidade tendem a aparecer de uma forma retardada (11). Todas as observações são registadas sistematicamente, mantendo-se uma ficha individual para cada animal.

Serão necessárias observações adicionais se os animais continuaram a apresentar sinais de toxicidade. As observações devem incluir alterações na pele e pêlos, olhos e membranas mucosas, aparelho respiratório, aparelho circulatório, sistema nervoso autónomo e central, assim como da actividade somatomotora e comportamental. Devem ser observados com especial atenção os tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. Devem ser tomados em consideração os princípios e critérios resumidos no Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (8). Os animais que forem encontrados em estado moribundo e os animais que apresentarem dores violentas ou sinais de sofrimento grave e continuado devem ser sacrificados sem dor. Quando os animais forem sacrificados a fim de evitar dor ou se forem encontrados mortos, deve ser registado o momento da morte com o maior rigor possível.

1.6.1. **Peso corporal**

O peso individual dos animais deve ser determinado pouco antes da administração da substância de ensaio e, seguidamente, pelo menos uma vez por semana. Devem ser calculadas e registadas todas as variações de peso. No final do ensaio, os animais sobreviventes são pesados e, seguidamente, sacrificados sem dor.

▼B

1.6.2. **Patologia**

Todos os animais de ensaio (incluindo os que morreram durante o ensaio ou que foram retirados do ensaio por motivos de preservação do seu bem-estar) devem ser sujeitos a uma autópsia pouco pormenorizada. Devem ser registadas as alterações patológicas principais observadas em cada animal. Deve também ser considerada a realização de um exame microscópico dos órgãos que mostrem sinais de patologia grave em animais que sobreviveram, no mínimo, durante 24 horas após a aplicação da dose inicial, já que este exame pode fornecer informação útil.

2. **DADOS**

Devem ser apresentados os dados individuais para cada animal. Adicionalmente, todos os dados devem ser resumidos em forma tabular, mostrando, para cada grupo de ensaio, o número de animais utilizado, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, o número de animais que foram encontrados mortos durante o ensaio ou que foram sacrificados a fim de evitar dor, o momento da morte de cada um dos animais, a descrição e evolução temporal dos efeitos de toxicidade e sua reversibilidade, assim como os resultados da autópsia.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Substância de ensaio:

— natureza física, pureza e propriedades físico-químicas relevantes (incluindo isomerização);

— dados relativos à identificação química, incluindo número CAS.

Excipiente (se apropriado):

— caso o excipiente não seja água, uma justificação para a sua escolha.

Animais de ensaio:

— espécie/estirpe usada;

— estado microbiológico do animal, caso seja conhecido;

— número, idade e sexo dos animais (incluindo, quando necessário, uma justificação para o uso de machos em vez de fêmeas);

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.

Condições do ensaio:

— informação pormenorizada sobre a formulação da substância de ensaio, incluindo informação detalhada sobre a forma física do material administrado;

— informação pormenorizada sobre a administração da substância de ensaio, incluindo volume das doses e momento de aplicação;

— informação pormenorizada sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo tipo e origem da dieta e origem da água);

— —justificação para a escolha da dose inicial.

▼B

Resultados:

— tabela dos dados de resposta e da dose para cada animal (ou seja, animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, natureza, gravidade e duração dos efeitos);

— tabela com indicação do peso corporal e suas variações;

— pesos individuais de animais no dia em que é aplicada a dose, uma vez por semana no restante período e na altura da sua morte ou sacrifício;

— data e momento da morte, no caso de ocorrência de morte antes do sacrifício previsto;

— evolução temporal do aparecimento de sintomas de toxicidade e sua reversibilidade, para cada animal;

— resultados da autópsia e resultados histopatológicos para cada animal, caso se encontrem disponíveis.

Análise dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Biometrics,* 20, 385.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. e Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 6, p. 279-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, RJ., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. e Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. *Fd. Chem. Toxicol.* 28, p. 469-482.

(4) Whitehead, A. e Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol*, 30, p. 313-324.

(5) Stallard, N. e Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol*, 14, p. 315- 323.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure.-Hum. Exp. Toxicol., 21, p. 183-196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment N. 19.

▼B

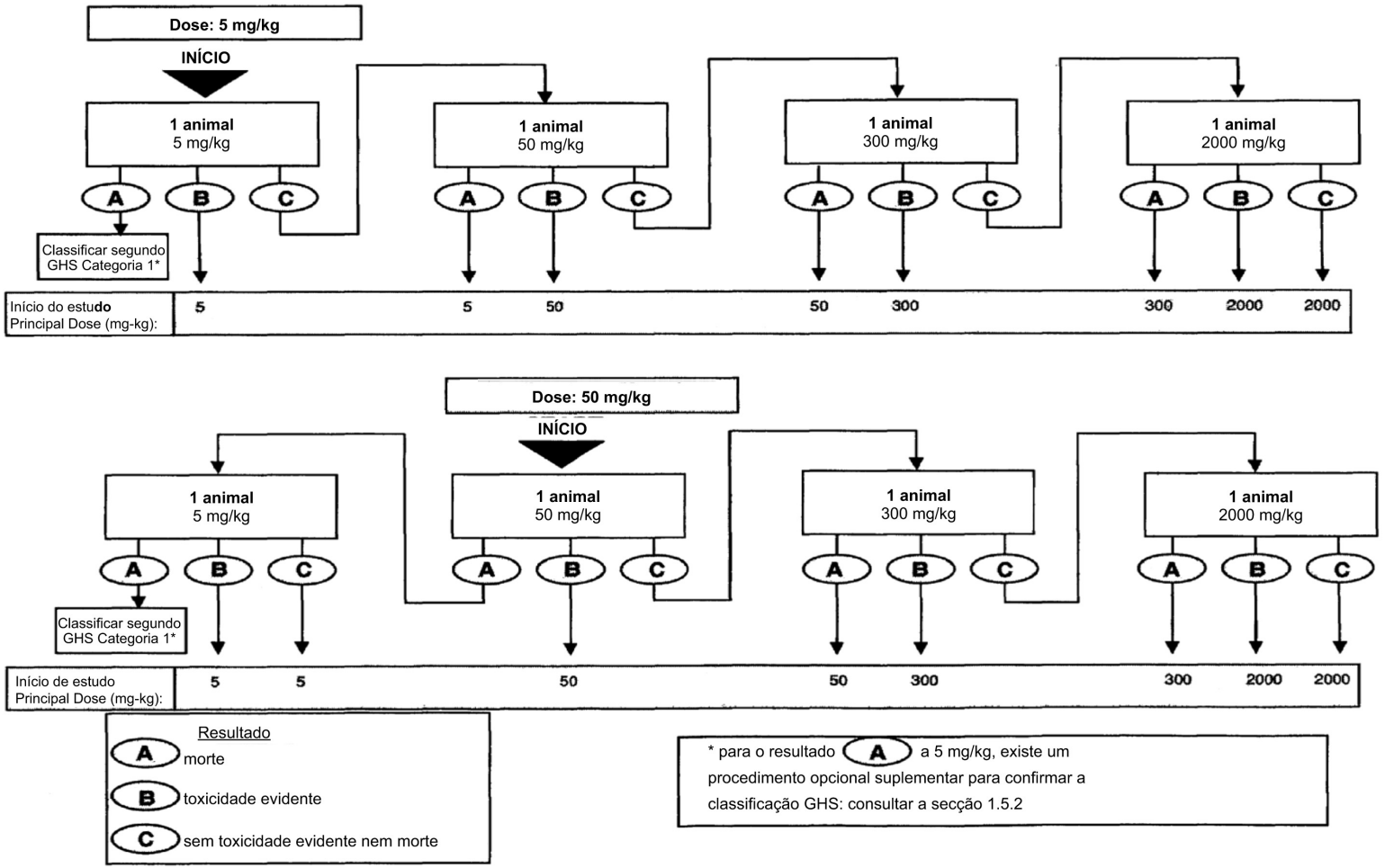
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN- documents-521-14-no--24-no-0,FF.html].

(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segai, L., Springer, J.A. e Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol*, 33, p. 223-231.

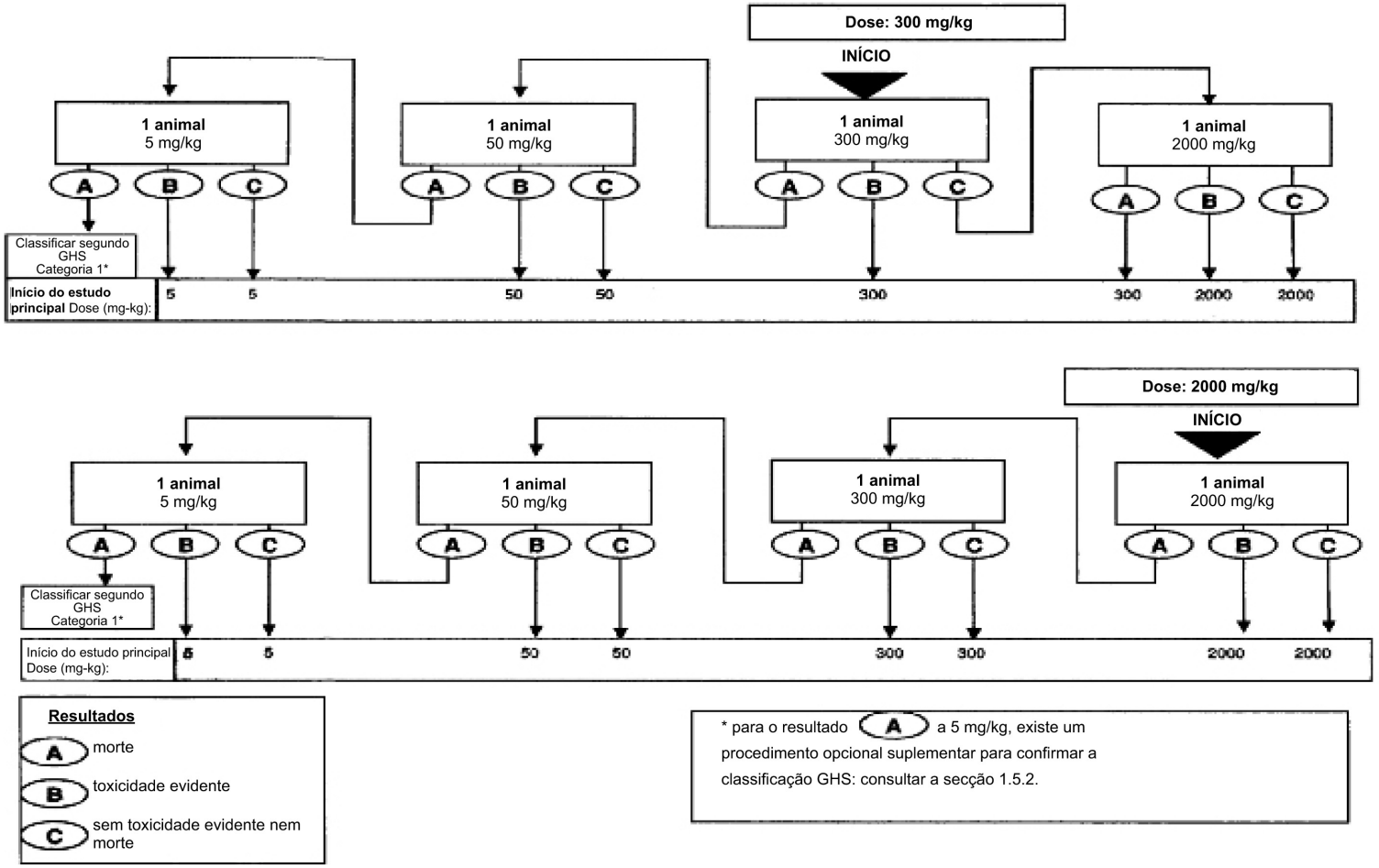
(11) Chan P.K e A.W. Hayes (1994), Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation . Em: *Principies and Methods of Toxicology*, 3 ª Edição. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd, New York, USA.

ANEXO 1

FLUXOGRAMA PARA O ESTUDO DE DETERMINAÇÃO DE AMPLITUDE

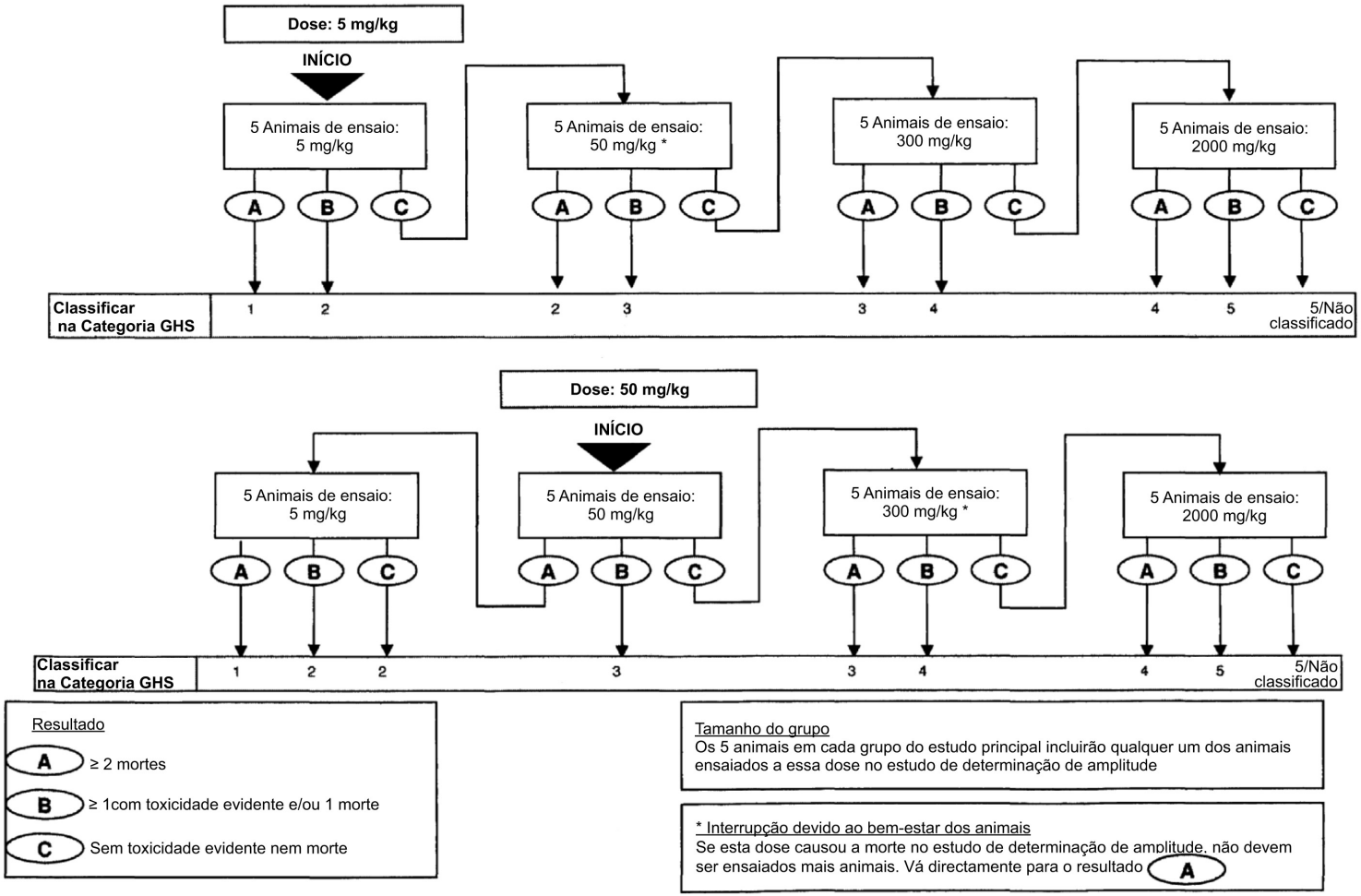


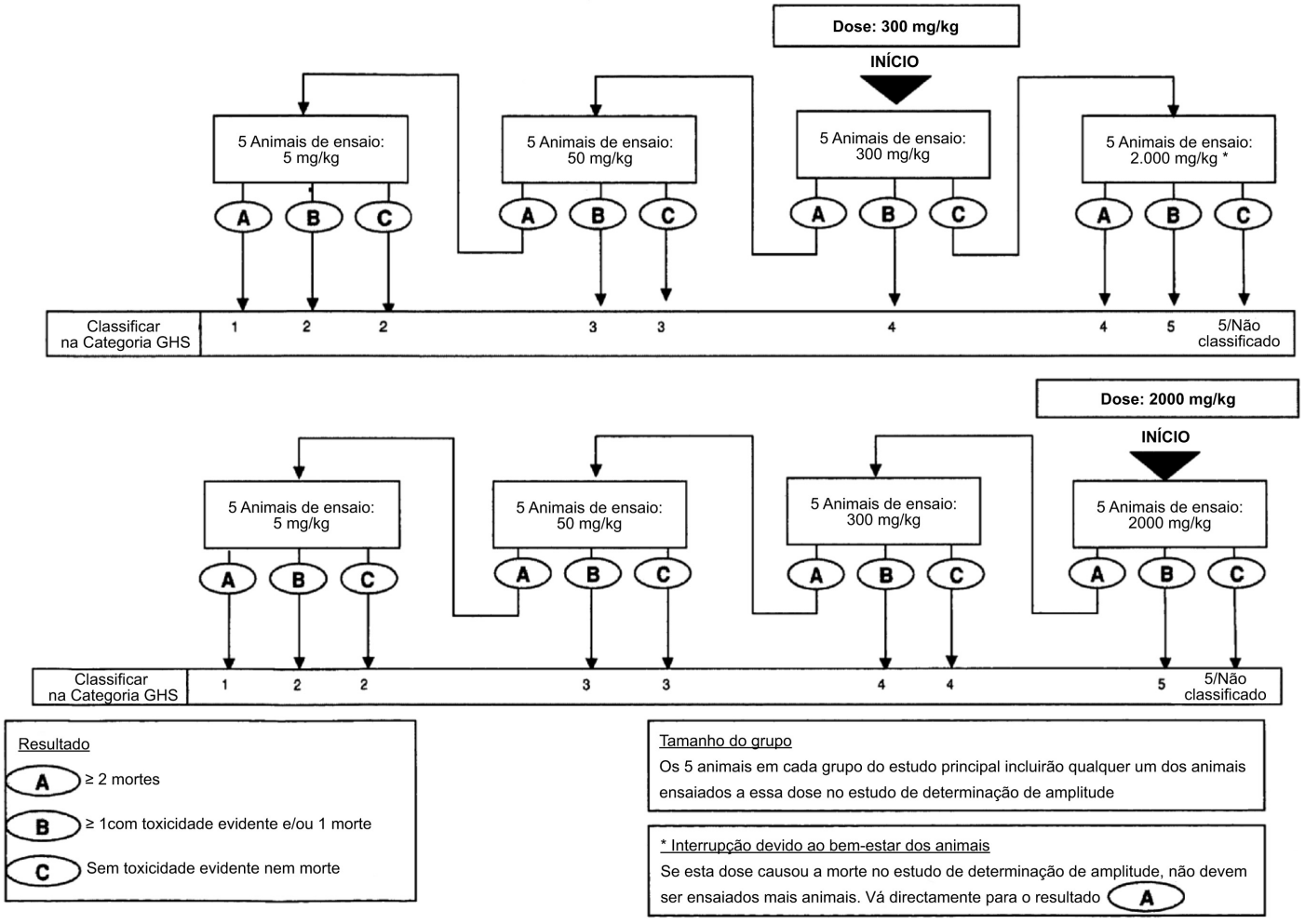
▼B


Dose: 300 mg/kg
INÍCIO
1 animal
5 mg/kg
1 animal
50 mg/kg
1 animal
300 mg/kg
1 animal
2000 mg/kg
A
B
C
Classificar segundo GHS Categoria 1*
Início do estudo principal Dose (mg-kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Dose: 2000 mg/kg
INÍCIO
1 animal
5 mg/kg
1 animal
50 mg/kg
1 animal
300 mg/kg
1 animal
2000 mg/kg
Classificar segundo GHS Categoria 1*
Início do estudo principal Dose (mg-kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Resultados
A morte
B toxicidade evidente
C sem toxicidade evidente nem morte
* para o resultado A a 5 mg/kg, existe um procedimento opcional suplementar para confirmar a classificação GHS: consultar a secção 1.5.2.

ANEXO 2

FLUXOGRAMA PARA O ESTUDO PRINCIPAL




Dose: 300 mg/kg
INÍCIO
5 Animais de ensaio: 5 mg/kg
5 Animais de ensaio: 50 mg/kg
5 Animais de ensaio: 300 mg/kg
5 Animais de ensaio: 2.000 mg/kg *
A B C
Classificar na Categoria GHS
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Não classificado
Dose: 2000 mg/kg
INÍCIO
5 Animais de ensaio: 5 mg/kg
5 Animais de ensaio: 50 mg/kg
5 Animais de ensaio: 300 mg/kg
5 Animais de ensaio: 2000 mg/kg
A B C
Classificar na Categoria GHS
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Não classificado
Resultado
A ≥ 2 mortes
B ≥ 1com toxicidade evidente e/ou 1 morte
C Sem toxicidade evidente nem morte
Tamanho do grupo
Os 5 animais em cada grupo do estudo principal incluirão qualquer um dos animais ensaiados a essa dose no estudo de determinação de amplitude
* Interrupção devido ao bem-estar dos animais
Se esta dose causou a morte no estudo de determinação de amplitude, não devem ser ensaiados mais animais. Vá directamente para o resultado A

▼B

ANEXO 3

CRITÉRIOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE ENSAIO COM VALORES PREVISÍVEIS DE DL_{50} SUPERIORES A 2 000 MG/KG PARA AS QUAIS NÃO É NECESSÁRIO EFECTUAR ENSAIO

Os critérios para a Categoria 5 de perigosidade destinam-se a permitir a identificação de substâncias de ensaio que representam um perigo de toxicidade aguda relativamente baixo, mas que, em certas circunstâncias, podem representar perigo para populações vulneráveis. É previsível que estas substâncias apresentem valores de DL_{50} orais ou dérmicos na gama de 2 000-5 000 mg/kg ou dose equivalente para outras vias. As substâncias de ensaio podem ser classificadas na categoria de perigosidade definida por: 2 000 mg/kg < DL_{50} < 5 000 mg/kg (Categoria 5 do GHS) nos seguintes casos:

a) se classificadas nesta categoria por qualquer dos esquemas de ensaio do anexo 2, baseados nas incidências de mortalidade;

b) se houver prova fiável indicativa de que os valores de DL_{50} se encontram na gama correspondente à Categoria 5 ou se outros estudos em animais ou sobre efeitos de toxicidade em seres humanos forem indicativos de preocupação acentuada em relação à salvaguarda da saúde humana;

c) através de extrapolação, estimativa ou medição de dados, desde que não seja garantida a atribuição a uma classe mais perigosa, e

— quando existe informação fiável indicativa de efeitos de toxicidade significativos em seres humanos, ou

— quando não é registada mortalidade nos ensaios por via oral até doses correspondentes aos valores para a Categoria 4, ou

— quando os especialistas são da opinião de que não se verificam sintomas clínicos de toxicidade significativos para ensaios até doses com valores correspondentes à Categoria 4, com excepção de diarreia, erecção pilosa ou má aparência, ou

— nos casos em que os especialistas confirmem a existência de informação fiável, proveniente de outros estudos com animais, indicativa da existência de potenciais efeitos agudos significativos.

ENSAIOS COM DOSES SUPERIORES A 2 000 MG/KG

Apenas pode ser considerada a utilização de uma dose fixa superior adicional de 5 000 mg/kg em casos excepcionais e justificados por necessidades específicas legais. Devido ao reconhecimento da necessidade de proteger o bem-estar dos animais, os ensaios com doses de 5 000 mg/kg são desencorajados e só devem ser considerados no caso de ser muito provável que os resultados desse ensaio tenham especial relevância para a protecção animal ou da saúde humana (9).

Estudo de determinação de amplitude

As regras de decisão para o procedimento sequencial apresentado no anexo 1 serão aplicadas ao ensaio com dose de 5 000 mg/kg. Assim, quando se utiliza uma dose de 5 000 mg/kg no estudo de determinação de amplitude, o resultado A (morte) requer o ensaio com um segundo animal com uma dose de 2 000 mg/kg. Os resultados B e C (toxicidade evidente ou sem toxicidade) permitem a selecção da dose de 5 000 mg/kg, como dose inicial do estudo principal. De igual modo, para uma dose inicial diferente de 5 000 mg/kg, o ensaio é realizado até à dose de 5 000 mg/kg se o resultado da dose de 2 000 mg/kg for B ou C. No caso de se obter um resultado A na subsequente dose de 5 000 mg/kg, a dose inicial do estudo principal deverá ser 2 000 mg/kg, enquanto para resultados B ou C deve utilizar-se uma dose inicial de 5 000 mg/kg no estudo principal.

▼B

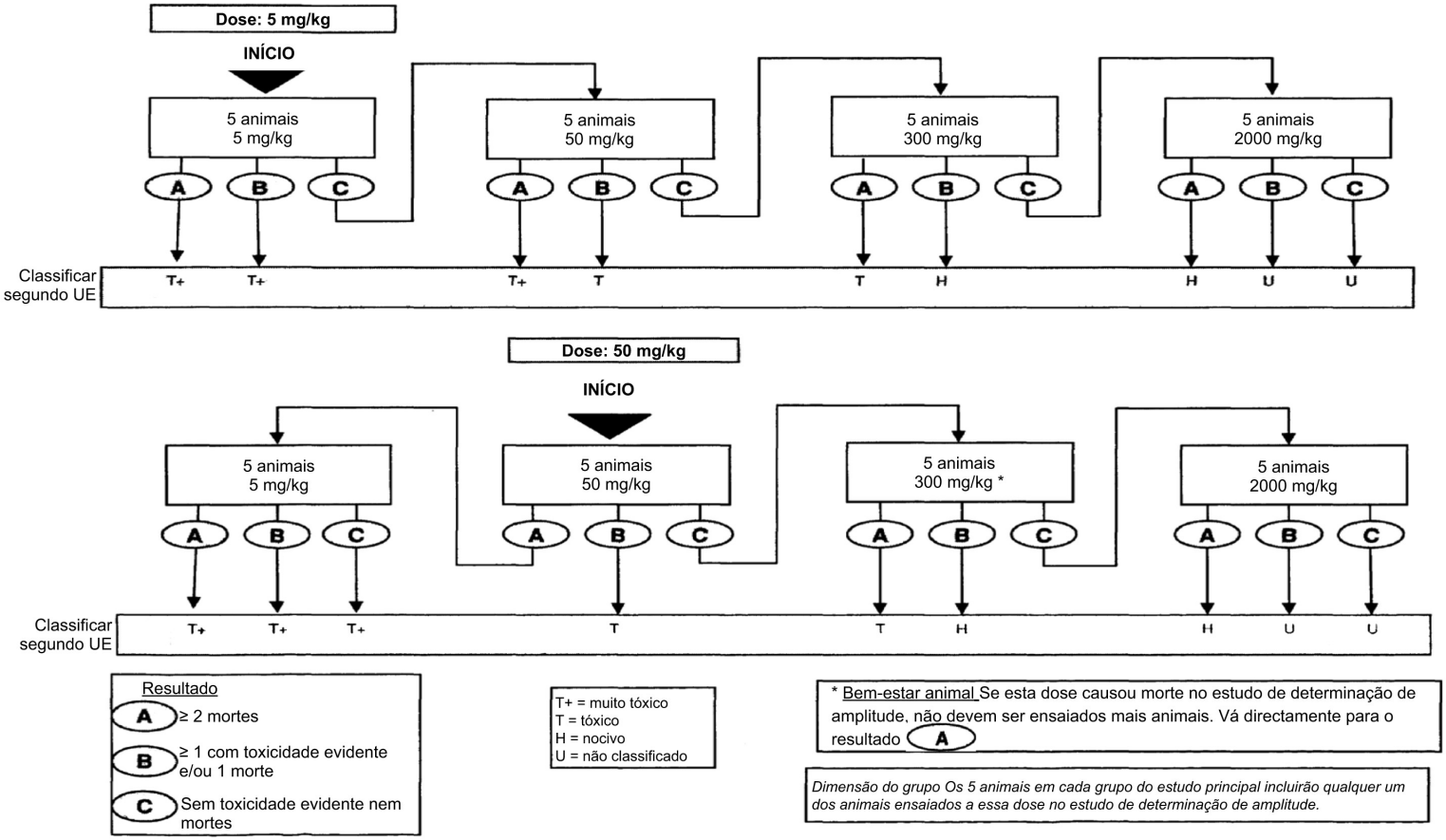
Estudo principal

As regras de decisão para o procedimento sequencial apresentado no anexo 2 serão aplicadas ao ensaio com dose de 5 000 mg/kg. Assim, quando se utiliza uma dose de 5 000 mg/kg no estudo principal, o resultado A (> duas mortes) requer o ensaio com um segundo grupo, com uma dose de 2 000 mg/kg. Os resultados B (toxicidade evidente e/ou < uma morte) ou C (sem toxicidade) não permitem a classificação da substância em conformidade com o GHS. De igual modo, para uma dose inicial diferente de 5 000 mg/kg, o ensaio é realizado até à dose de 5 000 mg/kg se o resultado da dose de 2 000 mg/kg for C. No caso de se obter um resultado A na subsequente dose de 5 000 mg/kg, a substância será classificada na Categoria 5 do GHS, enquanto um resultado B ou C não permite a classificação da substância.

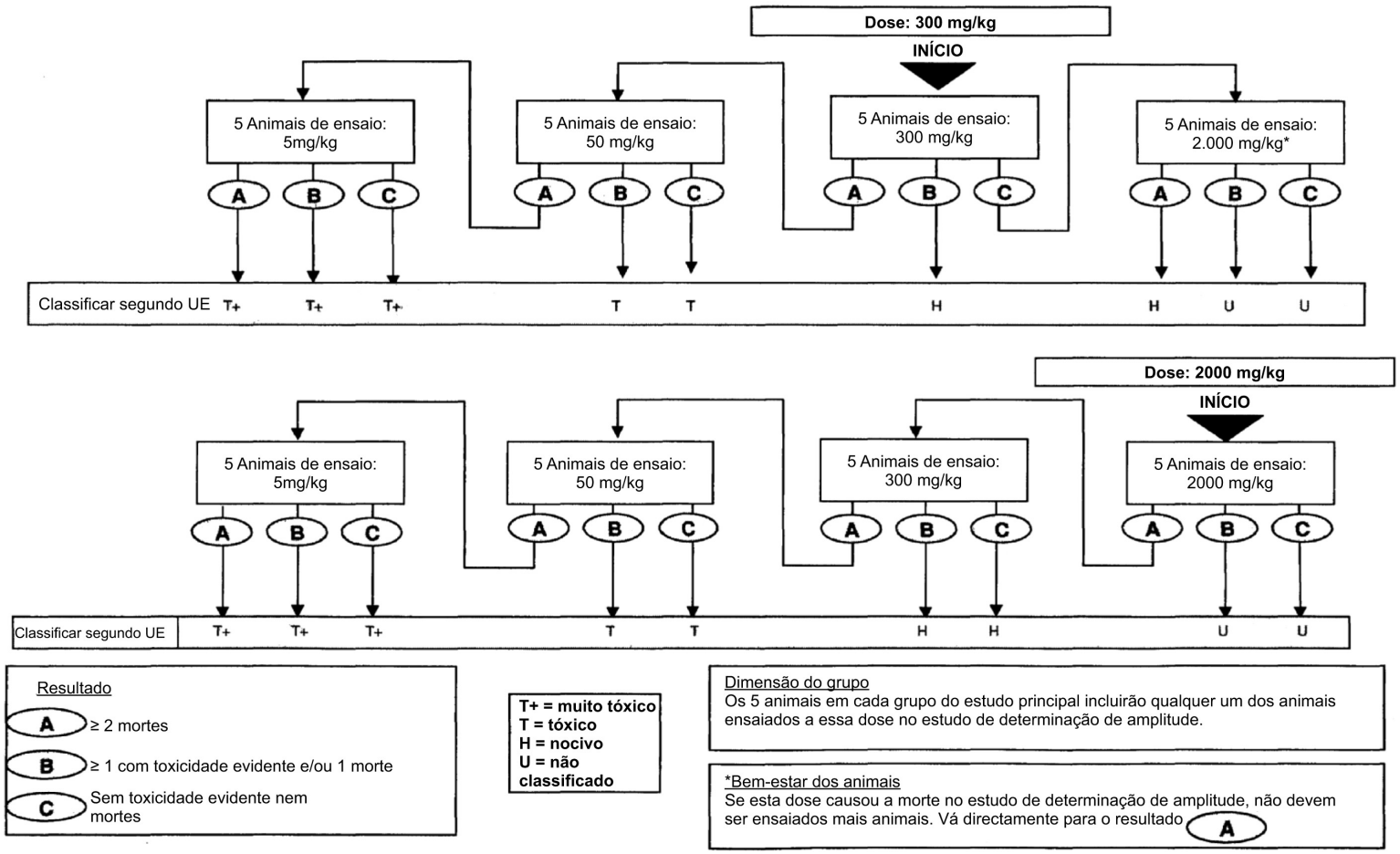
ANEXO 4

MÉTODO DE ENSAIO B.1 bis

Orientações sobre a classificação em conformidade com o esquema transitório da UE, válido até à implementação total do Sistema de Classificação Harmonizado a Nível Mundial (GHS) (obtido da referência (8))



▼B


Dose: 300 mg/kg
INÍCIO
5 Animais de ensaio: 5mg/kg
5 Animais de ensaio: 50 mg/kg
5 Animais de ensaio: 300 mg/kg
5 Animais de ensaio: 2.000 mg/kg*
A B C
Classificar segundo UE T+ T+ T+ T T H H U U
Dose: 2000 mg/kg
INÍCIO
5 Animais de ensaio: 5mg/kg
5 Animais de ensaio: 50 mg/kg
5 Animais de ensaio: 300 mg/kg
5 Animais de ensaio: 2000 mg/kg
Classificar segundo UE T+ T+ T+ T T H H U U
Resultado
A ≥ 2 mortes
B ≥ 1 com toxicidade evidente e/ou 1 morte
C Sem toxicidade evidente nem mortes
T+ = muito tóxico
T = tóxico
H = nocivo
U = não classificado
Dimensão do grupo
Os 5 animais em cada grupo do estudo principal incluirão qualquer um dos animais ensaiados a essa dose no estudo de determinação de amplitude.
*Bem-estar dos animais
Se esta dose causou a morte no estudo de determinação de amplitude, não devem ser ensaiados mais animais. Vá directamente para o resultado A

▼B

B.1.tris. **TOXICIDADE ORAL AGUDA — MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA**

1. **MÉTODO**

O presente método é equivalente ao «Test Guideline» TG 423 da OCDE (2001)

1.1. INTRODUÇÃO

O método de classificação de toxicidade aguda (1) estabelecido no presente ensaio é um procedimento gradual que utiliza três animais do mesmo sexo por etapa. Em média, consoante a mortalidade e/ou o estado moribundo dos animais, são necessárias 2-4 etapas para avaliar a toxicidade aguda da substância de ensaio. O presente procedimento é reprodutível, utiliza uma quantidade muito limitada de animais e permite classificar as substâncias de um modo semelhante a outros métodos de ensaio de toxicidade aguda. O método de classificação de toxicidade aguda baseia-se na avaliação biométrica (2) (3) (4) (5) com doses fixas, separadas apropriadamente de modo a permitir a avaliação da substância para fins de classificação e avaliação de perigosidade. O método, adoptado inicialmente em 1996, foi amplamente validado *in vivo* relativamente aos dados de DL_{50} publicados na literatura nacional (6) e internacional (7).

No Documento de Orientação sobre Ensaios de Toxicidade Oral Aguda (8) podem consultar-se as orientações sobre a selecção do método de ensaio mais apropriado a determinado fim. Este Documento de Orientação contém igualmente informação adicional sobre o procedimento e interpretação do Método de Ensaio B.1.tris.

No presente método de ensaio não é necessário administrar doses de substâncias de ensaio, que comprovadamente causam dor e sofrimento óbvios, devido à sua acção corrosiva ou gravemente irritante. Os animais moribundos ou que apresentam sinais óbvios de dor ou sofrimento grave e continuado devem ser sacrificados sem dor e, na interpretação dos resultados do ensaio, considerados do mesmo modo que os animais que morrem durante o ensaio. Os critérios sobre a decisão de sacrificar animais moribundos ou em sofrimento, bem como as orientações sobre o reconhecimento de morte previsível ou iminente, estão incluídos separadamente num Documento de Orientação (9).

O presente método utiliza doses estabelecidas previamente e os resultados permitem classificar a substância em conformidade com o Sistema Harmonizado ao Nível Mundial (GHS) para a classificação de substâncias químicas que causam toxicidade aguda (10).

Em princípio, o método não se destina a calcular rigorosamente os valores de DL_{50}, mas permite a determinação de gamas de exposição definidas, nas quais é expectável a ocorrência de mortes, dado que um dos principais critérios específicos do ensaio é a morte de uma dada proporção de animais. O método permite determinar valores de DL_{50} somente quando, pelo menos, duas das doses utilizadas resultam numa mortalidade superior a 0 % e inferior a 100 %. A utilização de uma selecção de doses, previamente estabelecidas, independentemente da substância de ensaio, com a classificação especificamente dependente do número de animais observados em vários estados melhora as condições de comunicação de resultados entre laboratórios, bem como a consistência e a repetibilidade dos resultados.

▼B

Antes de efectuar o estudo, o laboratório de ensaio deve ter em conta toda a informação disponível sobre a substância de ensaio. Esta informação incluirá a identificação e a estrutura química da substância, as suas propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros ensaios de toxicidade da substância *in vitro* ou *in vivo,* dados toxicológicos sobre substâncias estruturalmente semelhantes e a(s) utilização(ões) prevista(s) para a substância. Esta informação é necessária para satisfazer todos os envolvidos em relação à relevância do ensaio ao nível da protecção da saúde humana e será útil na determinação da dose inicial mais adequada.

1.2. DEFINIÇÕES

Toxicidade oral aguda: refere-se ao conjunto de efeitos adversos que se manifestam após a administração oral de uma dose única da substância ou de várias doses num período de 24 horas.

Morte retardada: significa que o animal não morre nem aparenta estar moribundo num período de 48 horas, mas morre mais tarde, no decorrer do período de observação de 14 dias.

Dose: quantidade aplicada da substância de ensaio. O valor da dose é expresso em peso de substância de ensaio por unidade de peso de animal de ensaio (por exemplo, mg/kg).

GHS: Sistema Harmonizado ao Nível Mundial (Globally Harmonised System) para a Classificação de Substâncias Químicas e Misturas. Trata-se de um trabalho conjunto da OCDE (saúde humana e ambiente), do Comité de Peritos em Transporte de Mercadorias Perigosas das Nações Unidas (propriedades físico-químicas) e da OIT (notificação de perigos) e coordenado pelo Programa Interorganizações para a Boa Gestão das Substâncias Químicas [Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC)].

Morte iminente: situação em que se prevê a ocorrência de estado moribundo ou morte antes da seguinte observação planeada. Alguns dos sinais indicativos deste estado em roedores incluem convulsões, posição lateral, posição deitada e tremores. [Para informação detalhada, consultar o Documento de Orientação sobre Critérios Específicos sem Dor (9)].

DL_{50} (Dose Letal Média): dose única, calculada estatisticamente, de uma substância susceptível de causar a morte de 50 % dos animais quando administrada por via oral. O valor da DL_{50} é expresso em peso de substância de ensaio por unidade de peso de animal de ensaio (mg/kg).

Dose-limite: refere-se a uma dose com o valor-limite superior admitido pelo ensaio (2 000 ou 5 000 mg/kg).

Estado moribundo: encontrar-se num estado de morte ou de incapacidade de sobrevivência, mesmo com tratamento. [Para informação detalhada, consultar o Documento de Orientação sobre Critérios Específicos sem Dor (9).]

Morte previsível: presença de sinais clínicos indicativos de ocorrência de morte em determinada altura, antes do final planeado da experiência; por exemplo: incapacidade de alcançar água ou comida. [Consultar o Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (9) para mais detalhes.]

▼B

1.3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O princípio do presente ensaio é que, com base num procedimento gradual com a utilização de um número mínimo de animais por etapa, é possível obter informação suficiente sobre a toxicidade aguda de uma substância de ensaio, de modo a permitir a sua classificação. A substância é administrada, por via oral, a um grupo de animais de ensaio a uma das doses anteriormente definidas. A substância é ensaiada utilizando um procedimento gradual, em que cada etapa utiliza três animais do mesmo sexo (normalmente fêmeas). A existência ou inexistência de mortalidade, relacionada com composto, dos animais tratados numa dada etapa, determinará a etapa seguinte, ou seja:

— não são necessários mais ensaios,

— é administrada a mesma dose a mais três animais,

— é administrada a dose seguinte, maior ou menor, a mais três animais.

No anexo 1 apresenta-se informação detalhada sobre o procedimento de ensaio. O método permitirá uma avaliação conducente à classificação da substância de ensaio numa das classes de toxicidade definidas pelos valores-limite de DL_{50}.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Selecção de espécies animais**

A espécie de roedores preferida para ensaio é o rato, mas podem ser utilizadas outras espécies de roedores. Normalmente, utilizam-se fêmeas (9). Tal escolha deve-se ao facto de uma análise da literatura científica relativa aos ensaios convencionais de DL_{50} revelar que, habitualmente, a diferença de sensibilidade entre os sexos é pequena e, nos casos em que são observadas diferenças, as fêmeas são, de um modo geral, ligeiramente mais sensíveis (11). No entanto, devem utilizar-se machos caso as propriedades toxicológicas ou tóxico-cinéticas descritas para substâncias químicas estruturalmente semelhantes indicarem que estes podem revelar maior sensibilidade. Quando o ensaio é efectuado com machos, deve ser apresentada uma justificação adequada.

Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis e pertencentes a estirpes laboratoriais de uso corrente. As fêmeas devem ser nulíparas e não grávidas. No início da administração das doses, todos os animais devem ter idades compreendidas entre as 8 e as 12 semanas e um peso compreendido no intervalo de ± 20 % do peso médio dos animais aos quais foram anteriormente administradas doses.

1.4.2. **Condições de alojamento e alimentação**

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser 22ºC (± 3ºC). A humidade relativa deverá ser 50 %-60 %, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30 % e um máximo que, de preferência, não deverá exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A alimentação pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber. Os animais aos quais é administrada a mesma dose podem ser agrupados na mesma gaiola, desde que o número de animais em cada gaiola não impeça a observação clara de cada um deles.

▼B

1.4.3. **Preparação dos animais**

Os animais são escolhidos ao acaso, marcados de modo a permitir uma identificação individualizada e mantidos nas suas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início da administração das doses para que se aclimatem às condições laboratoriais.

1.4.4. **Preparação das doses**

De um modo geral, as substâncias de ensaio devem ser administradas num volume constante ao longo de toda a gama de doses a ensaiar através da variação da concentração na preparação da dose. No entanto, para o caso do ensaio de um produto ou de uma mistura no estado líquido, pode ser mais relevante para a avaliação de risco subsequente a utilização da substância de ensaio sem qualquer diluição, ou seja, a concentração constante, sendo este um requisito apresentado por algumas autoridades competentes. Em qualquer dos casos, não deve ser excedido o volume máximo da dose a ser administrada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal de ensaio. No caso de roedores, o volume não deve exceder, em condições normais, 1 ml/100 g de peso corporal. Para soluções aquosas, contudo, pode ser considerada a dose de 2 ml/100 g de peso corporal. Recomenda-se que, sempre que possível, seja considerada em primeiro lugar a utilização de uma solução/suspensão/emulsão aquosa; caso tal não seja viável, pode considerar-se o uso de uma solução/suspensão/-emulsão em óleo (por exemplo, óleo de milho); em última instância, poderá eventualmente recorrer-se ao uso de soluções noutros excipientes. Devem conhecer-se as características toxicológicas dos excipientes que não sejam a água. As doses devem ser preparadas pouco tempo antes da sua administração, a menos que a estabilidade da preparação ao longo do período de utilização seja conhecida e tenha sido considerada aceitável.

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. **Administração de doses**

A administração por sonda esofágica deve ser feita, de preferência, numa toma única, usando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação apropriada. Nos casos raros em que não é possível a administração de uma toma única, a dose pode ser administrada em fracções menores ao longo de um período não superior a 24 horas.

Os animais devem ser sujeitos a jejum antes da administração das doses (por exemplo, no caso de ratos, não deve dar-se comida durante a noite, mas deve manter-se o fornecimento de água; no caso de ratinhos, a comida deve ser suspensa durante 3-4 horas e deve ser mantido o fornecimento de água). Após o período de jejum, os animais devem ser pesados e deve ser administrada a substância de ensaio. Após a administração da substância, pode evitar dar-se comida durante 3-4 horas para ratos e 1-2 horas para ratinhos. Nos casos de administração fraccionada da dose durante um certo lapso de tempo, pode ser necessário dar comida e água aos animais, consoante a duração do período de administração.

1.5.2. **Número de animais e doses**

São utilizados três animais em cada etapa. A dose a utilizar inicialmente deve ser seleccionada entre uma das quatro doses fixas de 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg de peso corporal. A dose inicial deve ser aquela que apresenta maior probabilidade de induzir mortalidade em alguns dos animais tratados. Os fluxogramas do anexo 1 descrevem o procedimento a seguir para cada uma das doses iniciais. Apresentam-se ainda, no anexo 4, as orientações sobre a classificação segundo o sistema da UE, em vigor até à implementação do novo GHS.

▼B

Quando a informação disponível for indicativa de que não é muito provável que ocorra mortalidade com a maior dose inicial (2 000 mg/kg de peso corporal), deve efectuar-se um teste-limite. Quando não existir qualquer informação disponível sobre a substância de ensaio, recomenda-se a utilização de uma dose inicial de 300 mg/kg de peso corporal por razões de protecção dos animais.

O intervalo de tempo entre os grupos de tratamento é determinado pelo aparecimento, duração e gravidade dos sinais de toxicidade. O tratamento dos animais com a dose seguinte deve ser adiado até ser possível estabelecer com segurança a sobrevivência dos animais previamente tratados.

Excepcionalmente, e apenas quando justificado por necessidades legais específicas, pode ser considerada a utilização de uma dose fixa superior adicional de 5 000 mg/kg (consultar o anexo 2). Por razões de protecção dos animais, é desencorajado o ensaio de animais na Categoria 5 do GHS (2 000-5 000 mg/kg) e esta dose só deve ser considerada quando existe uma elevada probabilidade de os resultados deste ensaio terem relevância directa para a protecção da saúde humana ou dos animais ou do ambiente.

1.5.3. **Teste-limite**

O teste-limite é utilizado, essencialmente, em situações nas quais o analista tem informação indicativa do material de ensaio não ser provavelmente tóxico, ou seja, só apresenta toxicidade acima das doses limite regulamentadas. A informação sobre a toxicidade do material de ensaio pode ser obtida a partir de ensaios em compostos semelhantes ou de ensaios de misturas ou produtos semelhantes, tendo em consideração a identificação e percentagem dos componentes cuja relevância toxicológica é conhecida. Nos casos em que a informação sobre a sua toxicidade é limitada ou inexistente ou nos casos em que é previsível que o material a ensaiar seja tóxico, deve ser efectuado o estudo principal.

Pode ser efectuado um teste-limite a uma dose de 2 000 mg/kg de peso corporal com seis animais (três animais por etapa). Excepcionalmente, pode ser efectuado um teste-limite a uma dose de 5 000 mg/kg de peso corporal com três animais (consultar o anexo 2). Caso ocorra mortalidade na sequência da administração da substância de ensaio, pode ser necessário efectuar ensaios posteriores com a dose inferior seguinte.

1.6. OBSERVAÇÕES

Após a aplicação da dose, os animais devem ser observados individualmente, pelo menos uma vez durante os primeiros trinta minutos e periodicamente durante as primeiras 24 horas, com especial cuidado nas primeiras quatro horas. Em seguida, é necessário observar os animais diariamente, durante um período de 14 dias, excepto se for necessário retirá-los do estudo e sacrificá-los sem dor por motivo de bem-estar dos animais, ou se forem encontrados mortos. No entanto, a duração do período de observação não deve ser estabelecida de uma forma rígida, mas determinada com base nas reacções de toxicidade, velocidade do seu aparecimento e duração do período de recuperação, que pode ser prolongado, se considerado necessário. O momento em que os sinais de toxicidade aparecem e desaparecem são importantes, sobretudo se os sinais de toxicidade tendem a aparecer de uma forma retardada (12). Todas as observações são registadas sistematicamente, mantendo-se uma ficha individual para cada animal.

▼B

Serão necessárias observações adicionais se os animais continuarem a apresentar sinais de toxicidade. As observações devem incluir alterações na pele e pêlos, olhos, membranas mucosas, aparelho respiratório, aparelho circulatório, sistema nervoso autónomo e central, assim como na actividade somatomotora e comportamental. Devem ser observados com especial atenção os tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. Devem ser tomados em consideração os princípios e critérios resumidos no Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (9). Os animais que forem encontrados em estado moribundo e os animais que apresentarem dores violentas ou sinais de sofrimento intenso e continuado devem ser sacrificados sem dor. Quando os animais forem sacrificados a fim de evitar dor ou se forem encontrados mortos, deve ser registado o momento da morte com o maior rigor possível.

1.6.1. **Peso corporal**

O peso individual dos animais deve ser determinado imediatamente após a administração da substância de ensaio e, seguidamente, pelo menos uma vez por semana. Devem ser calculadas e registadas todas as variações de peso. No final do ensaio, os animais sobreviventes são pesados e, seguidamente, sacrificados sem dor.

1.6.2. **Patologia**

Todos os animais de ensaio (incluindo aqueles que morreram durante o ensaio ou que foram retirados do ensaio por motivos de preservação do bem-estar do animal) devem ser sujeitos a uma autópsia pouco pormenorizada. Devem ser registadas as alterações patológicas principais observadas em cada animal. Deve também ser considerada a realização de um exame microscópico dos órgãos que mostrem sinais de patologia grave em animais que sobreviveram, no mínimo, 24 horas após a aplicação da dose inicial, já que este exame pode fornecer informação útil.

2. **DADOS**

Devem ser apresentados os dados individuais para cada animal. Adicionalmente, todos os dados devem ser resumidos em forma tabular, mostrando, para cada grupo de ensaio, o número de animais utilizado, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, o número de animais que foram encontrados mortos durante o ensaio ou que foram sacrificados a fim de evitar dor, o momento da morte de cada um dos animais, a descrição e evolução temporal dos efeitos de toxicidade e sua reversibilidade, assim como os resultados da autópsia.

3. **RELATÓRIO**

3.1. **Relatório do ensaio**

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Substância de ensaio:

— natureza física, pureza e propriedades físico-químicas relevantes (incluindo isomerização);

— dados relativos à identificação química, incluindo o número CAS.

Excipiente (se apropriado):

— caso o excipiente não seja água, uma justificação para a sua escolha.

Animais de ensaio:

— espécie/estirpe usada;

▼B

— estado microbiológico do animal, caso seja conhecido;

— número, idade e sexo dos animais (incluindo, quando necessário, uma justificação para o uso de machos em vez de fêmeas);

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.

Condições do ensaio:

— informação pormenorizada sobre a formulação da substância, incluindo informação pormenorizada sobre a forma física do material administrado;

— informação pormenorizada sobre a administração da substância de ensaio, incluindo volume das doses e o momento da aplicação;

— informação pormenorizada sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo tipo e origem da dieta, origem da água);

— justificação para a escolha da dose inicial.

Resultados:

— tabela dos dados de resposta e da dose para cada animal (ou seja, animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, natureza, gravidade e duração dos efeitos);

— tabela com indicação do peso corporal e suas variações;

— pesos individuais de animais no dia em que é aplicada a dose, uma vez por semana no restante período e na altura da sua morte ou sacrifício;

— data e momento da morte, no caso de ocorrência de morte antes do sacrifício previsto;

— evolução temporal do aparecimento de sintomas de toxicidade e sua reversibilidade para cada animal;

— resultados da autópsia e resultados histopatológicos para cada animal, caso se encontrem disponíveis.

Análise dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D., (1986) New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, p. 86.

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D., (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, p. 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E., (1994) The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, p. 559-610.

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E., (1995) The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, p. 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E., (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, p. 129-134.

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D., (1992) A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method — An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, p. 455-470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D., (1994) The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, p. 659-670.

(8) OECD, (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. Paris.

(9) OECD, (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.

(10) OECD, (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11. [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R. L., Cotruvo, J. A., Hill R. N., Bruce R. D., Stitzel K. A., Walker A. P., Chu I.; Goddard M, Segal L., Springer J. A. and Myers R. C., (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, p. 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes., (1994) Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press Ltd., New York, USA.

▼B

ANEXO 1

PROCEDIMENTO A SEGUIR PARA CADA UMA DAS DOSES INICIAIS

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os esquemas de ensaio, descritos no presente anexo, descrevem esquematicamente o procedimento a seguir para cada dose inicial.

— Anexo 1a: a dose inicial é de 5 mg/kg p.c.

— Anexo 1b: a dose inicial é de 50 mg/kg p.c.

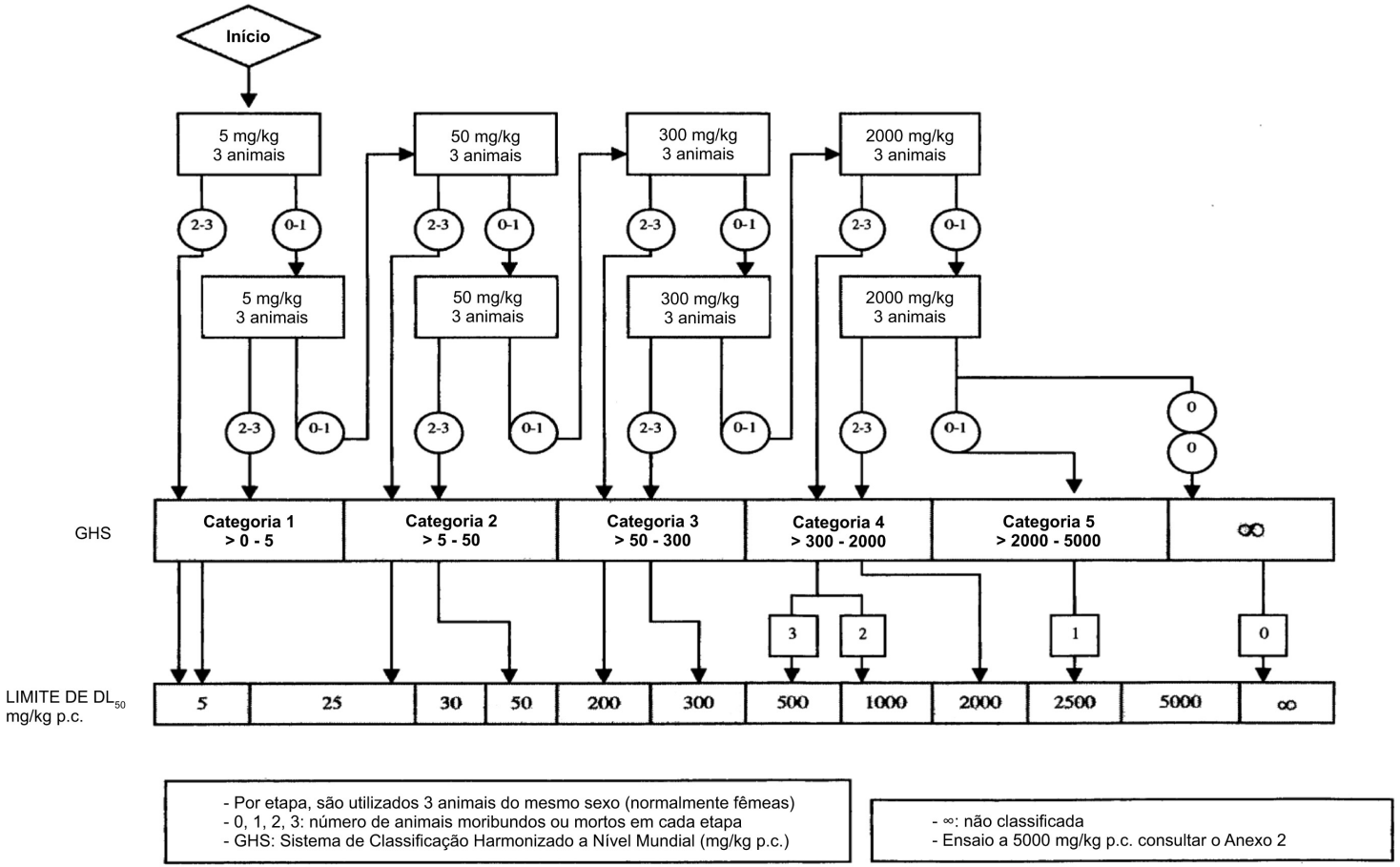
— Anexo 1c: a dose inicial é de 300 mg/kg p.c.

— Anexo 1d: a dose inicial é de 2 000 mg/kg p.c.

Consoante o número de animais sacrificados sem dor ou mortos, o procedimento de ensaio segue as setas respectivas.

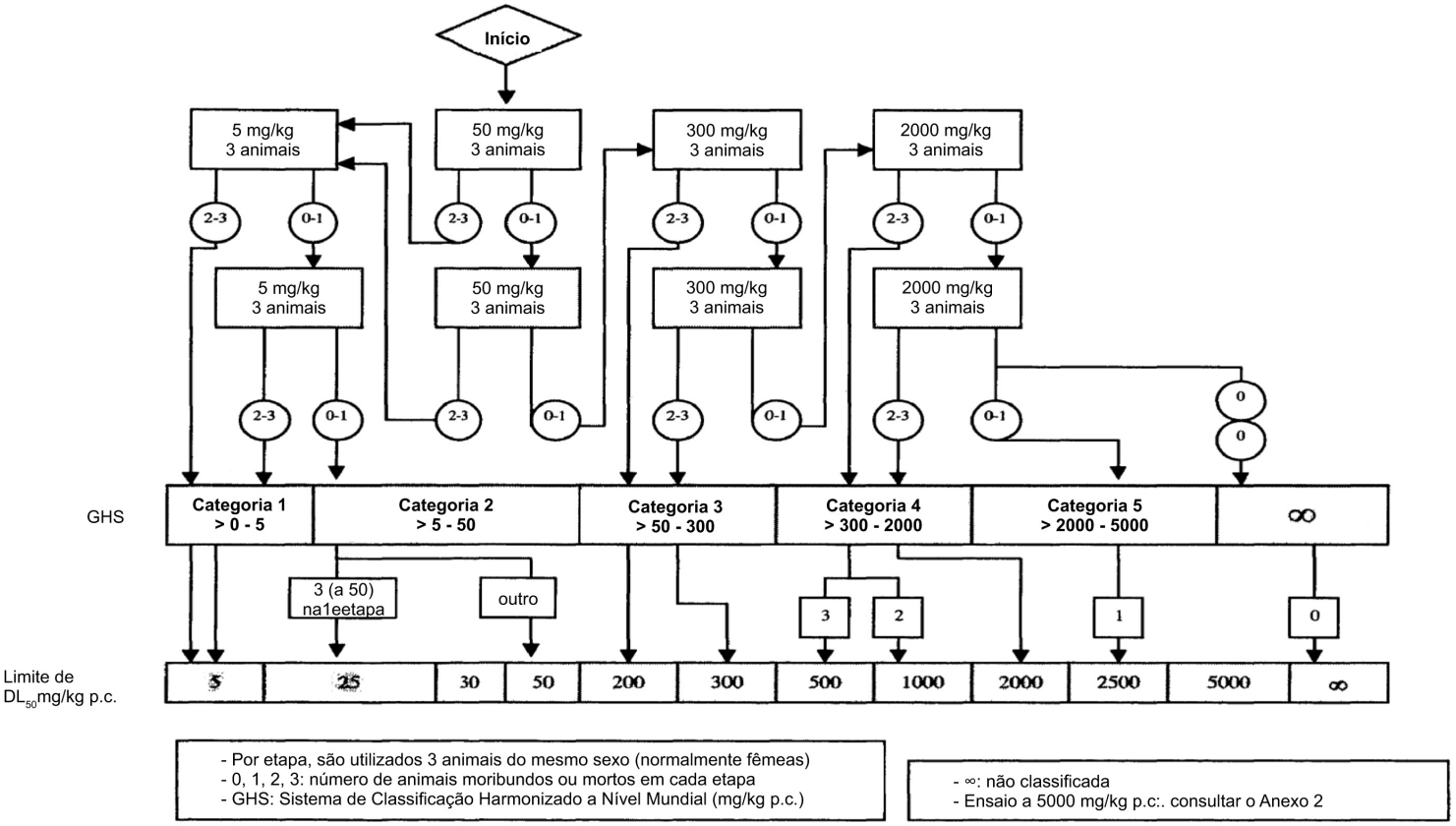
ANEXO 1

A PROCEDIMENTO DE ENSAIO COM UMA DOSE INICIAL DE 5 MG/KG DE PESO CORPORAL



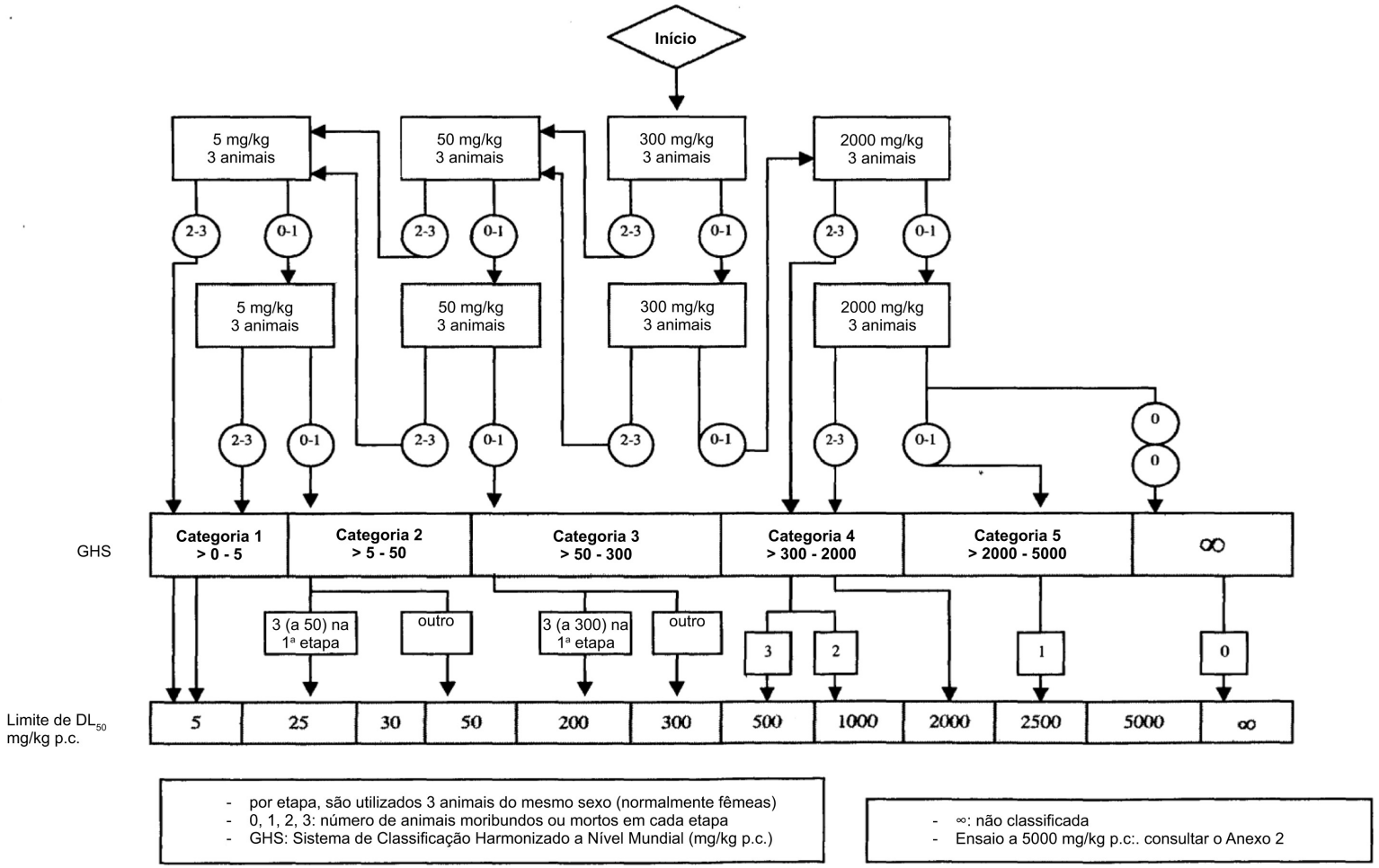
ANEXO 1 B

PROCEDIMENTO DE ENSAIO COM UMA DOSE INICIAL DE 50 MG/KG DE PESO CORPORAL



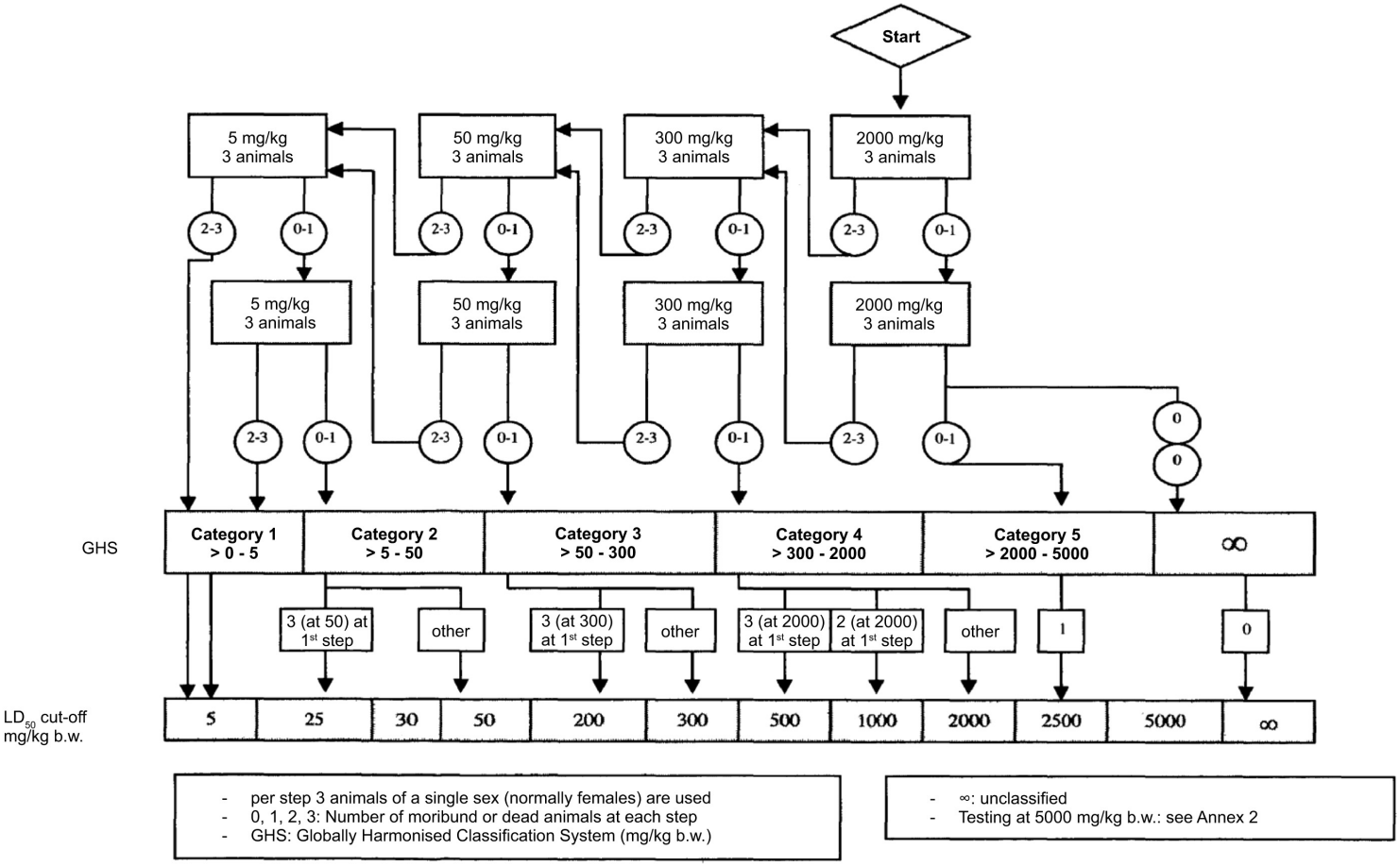
ANEXO 1 C

PROCEDIMENTO DE ENSAIO COM UMA DOSE INICIAL DE 300 MG/KG DE PESO CORPORAL



ANEXO 1 D

PROCEDIMENTO DE ENSAIO COM UMA DOSE INICIAL DE 2 000 MG/KG DE PESO CORPORAL



▼B

ANEXO 2

CRITÉRIOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE ENSAIO COM VALORES PREVISÍVEIS DE DL_{50} SUPERIORES A 2 000 MG/KG SEM NECESSIDADE DE EFECTUAR ENSAIO

Os critérios para a Categoria de Perigosidade 5 destinam-se a permitir a identificação de substâncias de ensaio que representam um perigo de toxicidade aguda relativamente baixo, mas que, em certas circunstâncias, podem representar perigo para populações vulneráveis. É previsível que tais substâncias apresentem valores de DL_{50} por via oral ou dérmica na gama de 2 000-5 000 mg/kg ou dose equivalente para outras vias. As substâncias de ensaio podem ser classificadas na categoria de perigosidade definida por: 2 000 mg/kg < DL_{50} < 5 000 mg/kg (Categoria 5 do GHS) nos seguintes casos:

a) se classificadas nesta categoria por qualquer dos esquemas de ensaio do anexo 1a-1d, baseados nas incidências de mortalidade;

b) se existir prova fiável indicativa de que os valores de DL_{50} se encontram na gama correspondente à Categoria 5 ou se outros estudos em animais ou sobre efeitos de toxicidade em seres humanos forem indicativos de preocupação acentuada em relação à salvaguarda da saúde humana;

c) através de extrapolação, estimativa ou medição de dados, desde que não seja garantida a atribuição a uma classe mais perigosa, e

   — quando existe informação fiável indicativa de efeitos de toxicidade significativos em seres humanos, ou

   — quando não é registada mortalidade nos ensaios por via oral até doses correspondentes aos valores para a Categoria 4, ou

   — quando o perito é de opinião de que não se verificam sintomas clínicos de toxicidade significativos para ensaios até doses com valores correspondentes à Categoria 4, com excepção de diarreia, erecção pilosa ou má aparência, ou

   — nos casos em que o perito confirme a existência de informação fiável, proveniente de outros estudos em animais que seja indicativa da existência de potenciais efeitos agudos significativos.

ENSAIOS COM DOSES SUPERIORES A 2 000 MG/KG

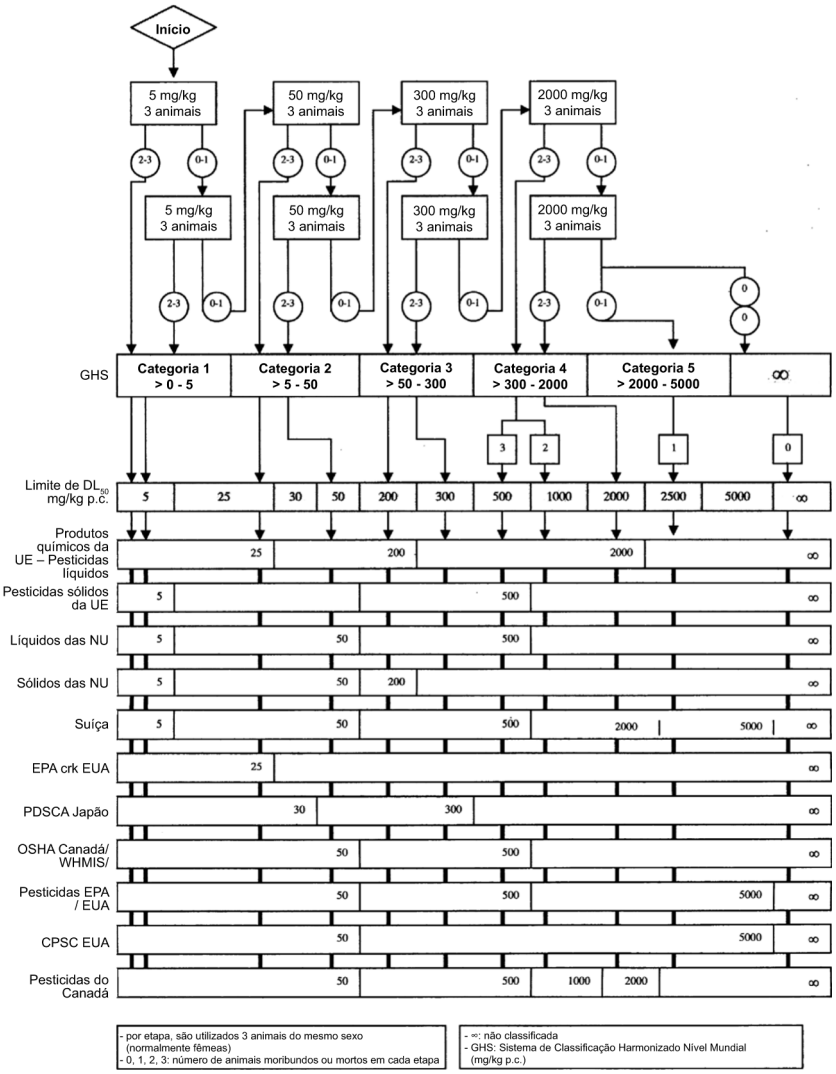
Devido ao reconhecimento da necessidade de proteger o bem-estar dos animais, os ensaios de animais na Categoria 5 (5 000 mg/kg) são desencorajados e só devem ser considerados no caso de ser muito provável que os resultados desse ensaio tenham especial relevância para a protecção da saúde humana ou animal (10). Não devem ser efectuados ensaios a doses superiores.

Quando é necessário efectuar o ensaio com uma dose de 5 000 mg/kg, só é necessária uma etapa (ou seja, três animais). Se o primeiro animal tratado morre, o ensaio prossegue a uma dose de 2 000 mg/kg, em conformidade com os fluxogramas do anexo 1. Se o primeiro animal sobrevive, são tratados dois outros animais. Se somente um dos três animais morrer, é de prever que o valor de DL_{50} seja superior a 5 000 mg/kg. Se ambos os animais morrerem, o ensaio prossegue com uma dose de 2 000 mg/kg.

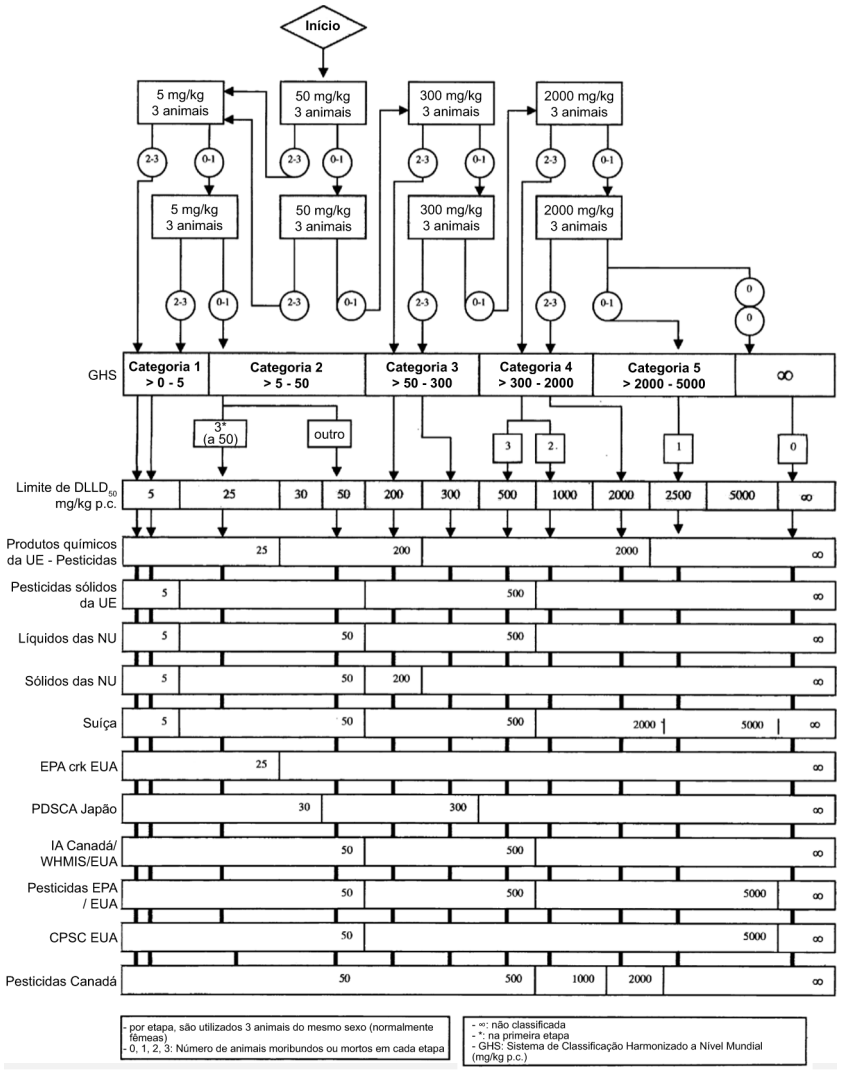
▼B

ANEXO 3

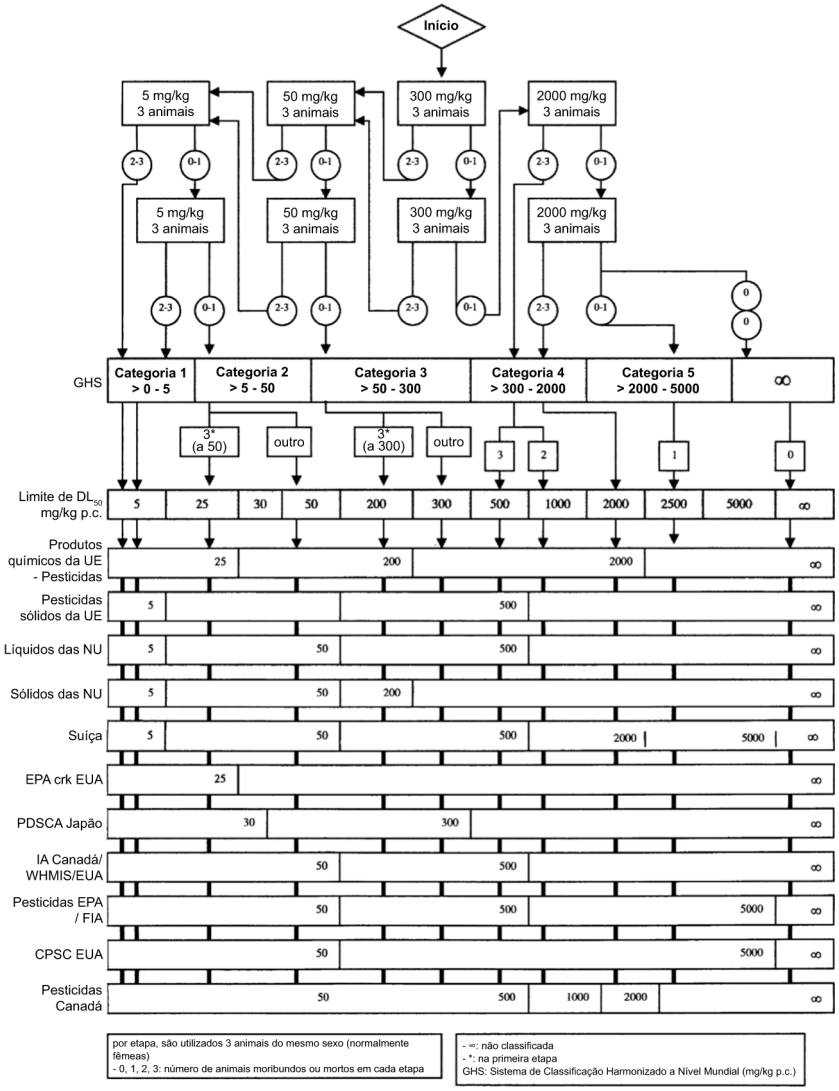
MÉTODO DE ENSAIO B.l.tris: Orientações sobre a classificação em conformidade com o esquema transitório da UE em vigor até à implementação total do Sistema de Classificação Harmonizado a Nível Mundial (GHS) [obtido da referência (8)]



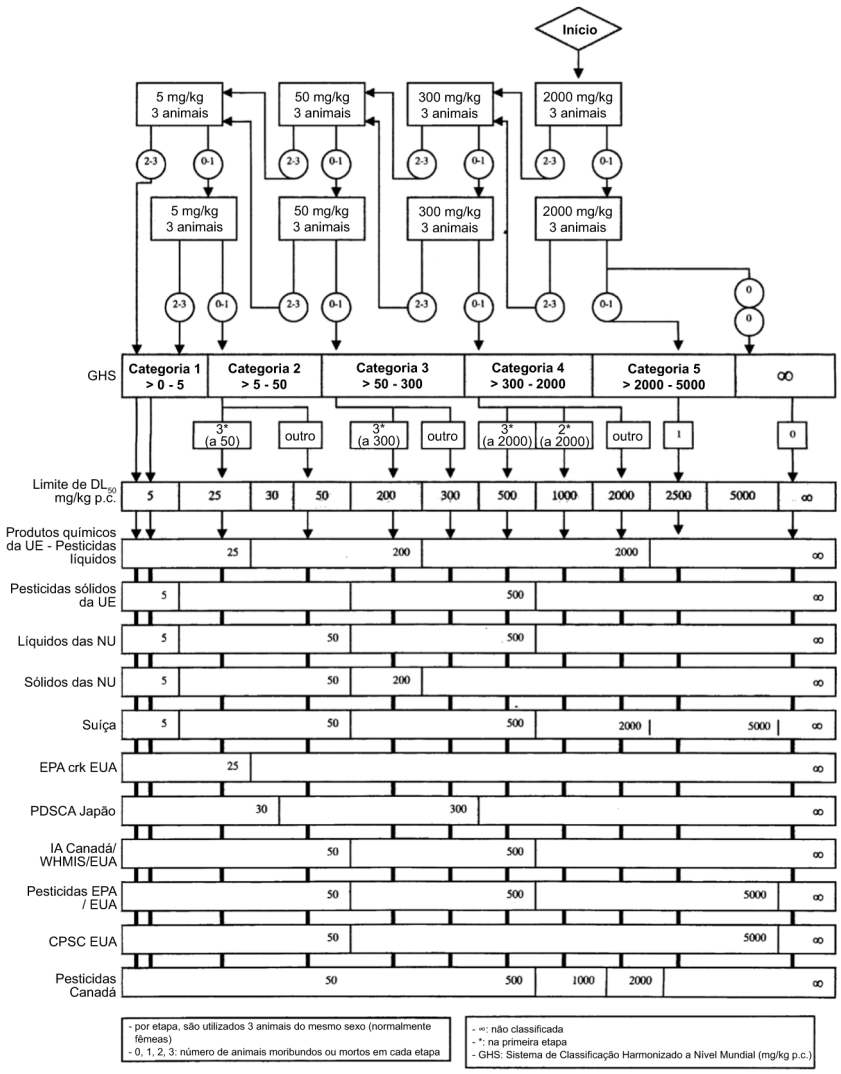
▼B


Início
5 mg/kg 3 animais
50 mg/kg 3 animais
300 mg/kg 3 animais
2000 mg/kg 3 animais
2-3
0-1
0
GHS
Categoria 1 > 0 - 5
Categoria 2 > 5 - 50
Categoria 3 > 50 - 300
Categoria 4 > 300 - 2000
Categoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
outro
Limite de DLLD50 mg/kg p.c.
Produtos químicos da UE - Pesticidas
Pesticidas sólidos da UE
Líquidos das NU
Sólidos das NU
Suíça
EPA crk EUA
PDSCA Japão
IA Canadá/ WHMIS/EUA
Pesticidas EPA / EUA
CPSC EUA
Pesticidas Canadá
- por etapa, são utilizados 3 animais do mesmo sexo (normalmente fêmeas)
- 0, 1, 2, 3: Número de animais moribundos ou mortos em cada etapa
- ∞: não classificada
- *: na primeira etapa
- GHS: Sistema de Classificação Harmonizado a Nível Mundial (mg/kg p.c.)

▼B


Início
5 mg/kg 3 animais
50 mg/kg 3 animais
300 mg/kg 3 animais
2000 mg/kg 3 animais
2-3
0-1
0
GHS
Categoria 1 > 0 - 5
Categoria 2 > 5 - 50
Categoria 3 > 50 - 300
Categoria 4 > 300 - 2000
Categoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
outro
3* (a 300)
3
2
1
Limite de DL50 mg/kg p.c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
Produtos químicos da UE - Pesticidas
Pesticidas sólidos da UE
Líquidos das NU
Sólidos das NU
Suíça
EPA crk EUA
PDSCA Japão
IA Canadá/ WHMIS/EUA
Pesticidas EPA / FIA
CPSC EUA
Pesticidas Canadá
por etapa, são utilizados 3 animais do mesmo sexo (normalmente fêmeas)
- 0, 1, 2, 3: número de animais moribundos ou mortos em cada etapa
- ∞: não classificada
- *: na primeira etapa
GHS: Sistema de Classificação Harmonizado a Nível Mundial (mg/kg p.c.)

▼B


Início
5 mg/kg 3 animais
50 mg/kg 3 animais
300 mg/kg 3 animais
2000 mg/kg 3 animais
2-3
0-1
0
GHS
Categoria 1 > 0 - 5
Categoria 2 > 5 - 50
Categoria 3 > 50 - 300
Categoria 4 > 300 - 2000
Categoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
outro
3* (a 300)
3* (a 2000)
2* (a 2000)
1
Limite de DL50 mg/kg p.c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
Produtos químicos da UE - Pesticidas líquidos
Pesticidas sólidos da UE
Líquidos das NU
Sólidos das NU
Suíça
EPA crk EUA
PDSCA Japão
IA Canadá/ WHMIS/EUA
Pesticidas EPA / EUA
CPSC EUA
Pesticidas Canadá
- por etapa, são utilizados 3 animais do mesmo sexo (normalmente fêmeas)
- 0, 1, 2, 3: número de animais moribundos ou mortos em cada etapa
- ∞: não classificada
- *: na primeira etapa
- GHS: Sistema de Classificação Harmonizado a Nível Mundial (mg/kg p.c.)

▼M4

B.2. TOXICIDADE AGUDA POR INALAÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 403 (2009) da OCDE (1). O *Test Guideline* 403 (TG 403) inicial relativo à toxicidade aguda por inalação foi adotado em 1981. Este método B.2 revisto (equivalente à versão revista do *Test Guideline* 403) visa maior flexibilidade, reduzir a utilização de animais e responder às exigências da regulamentação. Compreende dois tipos de estudos: um protocolo tradicional para determinação da CL_{50} e um protocolo de concentração em função do tempo (C × t). As principais características deste método são a capacidade de estabelecer uma relação de resposta à concentração na gama letal e não letal, tendo em vista o cálculo da mediana da concentração letal (CL_{50}), do limiar da concentração não letal (por exemplo, CL01) e do declive, bem como a capacidade de determinar se algum dos sexos tem maior sensibilidade. Deve recorrer-se ao protocolo C × t quando a regulamentação aplicável ou critérios científicos exigem o ensaio em animais durante vários períodos, nomeadamente para efeitos de planeamento da resposta a situações de emergência – por exemplo, para determinação de níveis-guia de exposição aguda (AEGL), estabelecimento de orientações destinadas ao planeamento da resposta a situações de emergência ou cálculo de limiares de exposição aguda – ou de ordenamento do território.

2. O *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing* (GD 39) (2) contém orientações para a realização e interpretação dos estudos previstos neste método de ensaio.

3. No final do capítulo e no referido GD 39 (2) são definidos alguns conceitos utilizados neste método.

4. Este método permite caracterizar produtos químicos, avaliar quantitativamente os riscos correspondentes e escaloná-los e classificá-los de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (3). O documento GD 39 (2) fornece orientações para a escolha do método adequado para o ensaio de efeitos agudos. Quando apenas são necessárias informações relativas à classificação e à rotulagem, o método normalmente recomendado é o do capítulo B.52 (4) deste anexo [ver o GD 39 (2)]. O método B.2 não se destina especificamente ao ensaio de materiais especiais, tais como matérias fibrosas ou isométricas pouco solúveis ou nanomateriais manufaturados.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

5. Antes de proceder a ensaios segundo este método, o laboratório deve ter em conta os elementos disponíveis sobre o produto químico, nomeadamente estudos já efetuados [por exemplo, com base no capítulo B.52 (4) deste anexo] cujos resultados eventualmente dispensem a realização de mais ensaios, a fim de minimizar a utilização de animais. Entre os elementos úteis para a escolha da espécie, da estirpe, do sexo, do modo de exposição e das concentrações mais adequados contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, resultados de ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana e dados (Q)SAR – "(*quantitative) structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade – e toxicológicos disponíveis sobre substâncias estruturalmente afins [ver o GD 39 (2)].

▼M4

6. Deve evitar-se o mais possível ensaiar produtos químicos corrosivos e/ou irritantes a concentrações que presumivelmente causarão dor e/ou sofrimento intensos. Para determinar se é possível renunciar a mais ensaios, deve avaliar-se o potencial corrosivo/irritante segundo critérios de especialistas na matéria, designadamente com base em elementos relativos a experiências em pessoas ou animais (por exemplo, provenientes de estudos de dose repetida realizados a concentrações não corrosivas/não irritantes), em dados *in vitro* [por exemplo, provenientes da aplicação dos métodos descritos nos capítulos B.40 (5) ou B.40.A (6) deste anexo ou do *Test Guideline 435* da OCDE (7)], em valores de pH, em informações relativas a substâncias similares ou noutros dados pertinentes. Para determinadas necessidades impostas pela regulamentação (por exemplo, fins de planeamento para situações de emergência), pode recorrer-se a este método para expor animais a matérias com essas características, pois o método permite ao diretor ou ao investigador principal do estudo gerir a escolha das concentrações visadas. Estas não devem induzir irritação/corrosão acentuada, mas devem ser suficientes para que a curva de resposta à concentração abranja os níveis correspondentes aos objetivos do ensaio, nos planos científico e da regulamentação. É necessário justificar as concentrações escolhidas em cada caso [ver o GD 39 (2)].

PRINCÍPIO DO MÉTODO

7. O método B.2 revisto visa obter informações suficientes sobre a toxicidade aguda de produtos químicos, a fim de permitir classificá-los e de obter os dados de letalidade (por exemplo, CL_{50}, CL_{01} e declive) para um ou ambos os sexos necessários à avaliação quantitativa dos riscos. O método contempla duas possibilidades. A primeira é um protocolo tradicional, no qual se expõem grupos de animais a uma concentração-limite (ensaio do limite) ou a uma série de concentrações gradualmente mais elevadas durante um período predeterminado, normalmente quatro horas. Por razões ligadas à regulamentação aplicável, a duração da exposição pode ser diferente. A segunda possibilidade é um protocolo $C \times t$, no qual se expõem grupos de animais a uma só concentração (concentração-limite), ou a uma série de concentrações, durante períodos variáveis.

8. Os animais moribundos ou que apresentem sinais óbvios de dor ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados e, na interpretação dos resultados do ensaio, ser considerados do mesmo modo que os animais que morrem no ensaio. O documento de orientações n.º 19 da OCDE, relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (8), define os critérios que devem presidir à decisão de eutanasiar animais moribundos ou em grande sofrimento, bem como orientações sobre o reconhecimento da morte previsível ou iminente.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

9. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. A espécie preferida é o rato. É necessário justificar a utilização de outras espécies.

Preparação dos animais

10. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas. No dia da exposição, os animais devem ser adultos jovens com oito a 12 semanas, de peso corporal não desviado mais de 20 % do peso médio correspondente a cada sexo dos animais da mesma idade anteriormente expostos. Os animais devem ser selecionados aleatoriamente e marcados para identificação individual. Para aclimatação às condições laboratoriais, devem permanecer nas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início do ensaio. Durante um curto período antes do ensaio, também devem ser aclimatados ao dispositivo de ensaio, para diminuir a tensão causada por um ambiente novo.

▼M4

Manutenção dos animais

11. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. O ideal será manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, embora isto possa não ser possível ao utilizar água como veículo. Antes e depois das exposições, os animais são geralmente engaiolados por sexo e por concentração, mas o número de animais por gaiola não deve dificultar a clara observação de cada animal e deve minimizar as perdas devidas a lutas ou canibalismo. Quando se opta pela exposição unicamente nasal dos animais, pode ser necessário aclimatá--los aos tubos de contenção. Estes não devem provocar aos animais tensões físicas, térmicas ou dinâmicas excessivas. A contenção dos animais pode afetar parâmetros fisiológicos como a temperatura corporal (hipertermia) e/ou o volume respirado por minuto. Caso se disponha de dados genéricos reveladores de que nenhuma destas alterações ocorre em grau apreciável, não será necessária a preadaptação aos tubos de contenção. Os animais cujo corpo seja exposto na totalidade a um aerossol devem permanecer em gaiolas individuais durante a exposição, para evitar que o aerossol seja filtrado pela pelagem dos que com eles coabitem. Exceto nos períodos de exposição, podem utilizar-se dietas convencionais certificadas de laboratório, com fornecimento ilimitado de água potável da rede pública. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão.

Câmaras de inalação

12. Ao escolher-se a câmara de inalação, deve ter-se em conta a natureza do produto químico em estudo e o objetivo do ensaio. Privilegia-se o modo de exposição unicamente nasal, termo que abrange as exposições "unicamente da cabeça", "unicamente do nariz" e "unicamente do focinho". A exposição unicamente nasal é geralmente preferida no estudo de aerossóis de líquidos ou de sólidos, ou de vapores que possam condensar-se e formar aerossóis. Para determinados objetivos do estudo, poderá ser melhor recorrer ao modo de exposição do corpo inteiro, mas será necessário justificá-lo no relatório. Para garantir estabilidade atmosférica nas câmaras de corpo inteiro, o volume de todos os animais presentes em cada câmara não deve exceder 5 % do volume da câmara. O documento GD 39 (2) descreve os princípios, vantagens e desvantagens das técnicas de exposição unicamente nasal e do corpo inteiro.

CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Administração das concentrações

13. As exposições unicamente nasais de ratos podem durar até seis horas. As exposições unicamente nasais de ratinhos geralmente não vão além de quatro horas. Caso sejam necessários estudos mais longos, é necessário justificá-lo [ver o GD 39 (2)]. Os animais expostos a aerossóis em câmaras de corpo inteiro devem ser alojados individualmente, para evitar que animais coabitantes ingiram o produto químico em estudo ao lamberem-se uns aos outros. Durante o período de exposição, a alimentação deve ser suspensa. Durante as exposições do corpo inteiro pode continuar a fornecer-se água.

14. Os animais são expostos ao produto químico em estudo sob a forma de gás, vapor, aerossol ou de uma mistura destes. O estado físico a ensaiar depende das propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, da concentração escolhida e/ou da forma física cuja probabilidade de presença durante a manipulação e utilização do mesmo seja maior. Os produtos químicos higroscópicos ou quimicamente reativos devem ser ensaiados em atmosfera seca. Devem tomar-se precauções para evitar concentrações que possam provocar explosões.

▼M4

Distribuição granulométrica

15. Os aerossóis e os vapores que possam condensar-se em aerossóis devem ser objeto de análise granulométrica. Para que todas as zonas pertinentes do aparelho respiratório sejam expostas, recomenda-se a utilização de aerossóis com diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) compreendido entre 1 μm e 4 μm e desvio-padrão geométrico (σ_g) compreendido entre 1,5 e 3,0 (2)(9)(10). Deve fazer-se o razoavelmente possível para respeitar estas condições, sendo necessário um parecer especializado caso isso não se consiga. Por exemplo, as partículas dos fumos metálicos podem ser mais pequenas do que o limite inferior indicado, ao passo que as partículas carregadas, as fibras e as matérias higroscópicas (que aumentam de volume no ambiente húmido do aparelho respiratório) podem exceder o limite superior.

Incorporação do produto químico em estudo num veículo

16. Pode utilizar-se um veículo para obter a concentração e a granulometria adequadas do produto químico na atmosfera. Regra geral, deve preferir-se a água. As matérias em partículas podem ser sujeitas a processos mecânicos destinados a obter a distribuição granulométrica necessária, mas tendo o cuidado de não decompor nem alterar o produto químico em estudo. Quando houver indícios de que um processo mecânico possa ter alterado a composição do produto químico em estudo (por exemplo, devido às altas temperaturas geradas pela fricção numa moagem excessiva), será necessário verificá-la por meios analíticos. Devem tomar-se as precauções adequadas para não contaminar o produto químico em estudo. Não é necessário ensaiar matérias granulosas não friáveis intencionalmente formuladas para não serem inaláveis. Para demonstrar que a manipulação de uma matéria granulosa não gera partículas respiráveis, efetua-se um ensaio de desgaste. Se este gerar substâncias respiráveis, deve realizar-se um ensaio de toxicidade por inalação.

Animais de controlo

17. Não é necessário um grupo de controlo negativo (do ar) em paralelo. Caso se utilize um veículo diverso da água para gerar a atmosfera a ensaiar, só se utilizará um grupo de controlo do veículo se não se dispuser de dados históricos de toxicidade por inalação. Se um estudo de toxicidade de um produto químico incorporado num determinado veículo não revelar toxicidade, conclui-se que o veículo em causa não é tóxico à concentração ensaiada, não sendo necessário nenhum grupo de controlo do veículo.

MONITORIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Caudal de ar nas câmaras

18. Durante cada exposição, é necessário regular cuidadosamente, monitorizar continuamente e registar pelo menos de hora a hora o caudal de ar através de cada câmara. A monitorização da concentração (ou estabilidade) da atmosfera em estudo constitui uma medida permanente de todos os parâmetros dinâmicos e um meio indireto de regular os que intervêm na geração da atmosfera em estudo. É necessário ter especial cuidado em evitar reinalações nas câmaras de exposição unicamente nasal, evitando que o fluxo de ar através do sistema de exposição seja incapaz de produzir uma circulação dinâmica da atmosfera que contém o produto químico em estudo. Existem metodologias a que pode recorrer-se para demonstrar que não ocorrem reinalações nas condições experimentais escolhidas (2)(11). A concentração de oxigénio não deve ser inferior a 19 % e a concentração de dióxido de carbono não deve exceder 1 %. Se houver razões para crer que estas concentrações não são respeitadas, é necessário medi-las.

▼M4

Temperatura e humidade relativa nas câmaras

19. Deve manter-se a temperatura nas câmaras a 22 °C ± 3 °C. Tanto no caso das exposições unicamente nasais como das exposições do corpo inteiro, é necessário monitorizar a humidade relativa na zona de respiração dos animais e registá-la pelo menos três vezes (duração do ensaio até quatro horas) ou de hora a hora (durações mais curtas). O ideal seria manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, mas isso pode não ser possível – por exemplo, quando se estudam misturas aquosas – ou pode não ser mensurável (devido a interferências do produto químico em estudo com o método de ensaio).

Concentração nominal do produto químico em estudo

20. Sempre que possível, deve calcular-se e registar-se a concentração nominal na câmara de exposição. Esta é dada pela divisão da massa gerada do produto químico em estudo pelo volume de ar total que circulou pelo sistema da câmara. A concentração nominal não é utilizada para caracterizar a exposição dos animais, mas a sua comparação com a concentração real dá uma indicação da eficácia de geração do sistema de ensaio, podendo ser utilizada para detetar problemas a esse nível.

Concentração real do produto químico em estudo

21. Entende-se por "concentração real do produto químico em estudo", a concentração do produto químico na zona de respiração dos animais da câmara de inalação. As concentrações reais podem determinar-se por métodos específicos (por exemplo, amostragem direta ou métodos de adsorção ou de reação química e posterior caracterização analítica) ou por métodos inespecíficos, tais como gravimetria após filtração. O método gravimétrico só é aceitável para aerossóis de pós com um único componente ou de líquidos pouco voláteis e deve apoiar-se em caracterizações adequadas específicas do produto químico em causa efetuadas antes da realização do estudo. A concentração de aerossóis de pós com vários componentes também pode determinar-se por gravimetria. Todavia, são necessários para isso dados analíticos que demonstrem que a composição do produto transportado no aerossol é semelhante à do produto inicial. Se não se dispuser desses dados, pode ser necessário reanalisar periodicamente o produto químico em estudo (idealmente no aerossol) durante o ensaio. No caso dos agentes aerossolizados que possam evaporar-se ou sublimar, é necessário demonstrar que todas as fases são recolhidas pelo método escolhido. As concentrações visadas, nominais e reais devem figurar no relatório do estudo, mas apenas as concentrações reais são utilizadas na análise estatística para cálculo dos valores letais de concentração.

22. Deve utilizar-se, se possível, apenas um lote do produto químico em estudo e a amostra em estudo deve ser conservada em condições que preservem a sua pureza, homogeneidade e estabilidade. Antes de iniciar o estudo, deve caracterizar-se o produto químico em causa no que respeita à sua pureza e, se tecnicamente viável, à sua identidade e às quantidades dos contaminantes e impurezas nele identificados. Para o efeito, pode recorrer-se, entre outros, a tempos de retenção e áreas relativa de picos, pesos moleculares obtidos por espetrometria de massa ou cromatografia em fase gasosa ou outras estimativas. Embora a identidade da amostra a estudar não seja da responsabilidade do laboratório, pode ser aconselhável que este confirme, pelo menos, alguns aspetos da caracterização efetuada pelo cliente (cor, natureza física, etc.).

23. Deve manter-se a atmosfera de exposição tão constante quanto possível e proceder-se à sua monitorização continuamente e/ou intermitentemente, consoante o método de análise. Caso se proceda a uma colheita de amostras intermitente, num estudo de quatro horas deve recolher-se uma amostra da atmosfera da câmara pelo menos duas vezes. Se, isso não for viável, por limitações relacionadas com o caudal de ar ou devido a concentrações baixas, pode colher-se uma amostra ao longo de todo o período de exposição. Se ocorrerem variações pronunciadas de uma amostra para outra, devem colher-se quatro amostras por exposição nas concentrações seguintes.

▼M4

A concentração na câmara correspondente a uma determinada amostra não deve desviar-se da concentração média mais de 10 %, no caso de gases e vapores, nem mais de 20 %, no caso de aerossóis de líquidos ou de sólidos. Deve calcular-se e registar-se o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio (t_{95}). A duração da exposição corresponde ao tempo de geração do produto químico em estudo, incluído o tempo necessário para atingir t_{95}. O documento GD 39 (2) contém orientações para a estimativa do t_{95}.

24. No caso de misturas muito complexas de gases ou vapores e de aerossóis (por exemplo, atmosferas de combustão e produtos químicos gerados por produtos ou dispositivos finais específicos), o comportamento de cada fase na câmara de inalação pode ser diferente. Por esse motivo, deve escolher-se em cada fase (gás ou vapor e aerossol) pelo menos uma substância indicadora (substância analisada), normalmente a principal substância ativa da mistura. Se o produto químico em estudo for uma mistura, deve indicar-se no relatório a concentração analítica correspondente à mistura e não apenas a concentração correspondente à substância ativa ou ao componente (substância analisada) em causa. O documento GD 39 (2) contém mais informações sobre as concentrações reais.

Distribuição granulométrica do produto químico em estudo

25. Deve determinar-se a distribuição granulométrica dos aerossóis pelo menos duas vezes durante cada exposição de quatro horas, recorrendo a um impactor de cascata ou a outro instrumento, tal como um granulómetro aerodinâmico. Se for possível demonstrar a equivalência dos resultados obtidos pelo impactor de cascata e pelo instrumento alternativo, pode utilizar-se este último em todo o estudo. Em paralelo ao instrumento primário, deve utilizar-se um segundo dispositivo, tal como um filtro gravimétrico ou um borbulhador de gás/impactor *impinger*, para confirmar a eficiência de captação do primeiro. As concentrações mássicas obtidas por análise granulométrica e por análise com filtros não devem diferir entre si mais do que valores razoáveis [ver o GD 39 (2)]. Se for possível demonstrar esta equivalência no início do estudo, não é necessário efetuar mais medições de confirmação. Por razões de bem-estar animal, devem ser tomadas medidas para minimizar dados inconclusivos que possam obrigar à repetição de exposições. É necessário efetuar uma análise granulométrica no caso dos vapores que possam condensar-se para formar aerossóis ou se forem detetadas partículas numa atmosfera de vapores suscetível de formar fases mistas (ver o ponto 15).

PROCEDIMENTO

26. São descritos a seguir dois tipos de estudo: o protocolo tradicional e o protocolo C × t. Ambos podem compreender um estudo preliminar, um estudo principal e/ou um ensaio do limite (no protocolo tradicional) ou um ensaio a uma concentração-limite (C × t). Se um dos sexos for reconhecidamente mais sensível, fica ao critério do diretor do estudo efetuar estes estudos apenas a esse sexo. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Antes de iniciar o estudo deve atender-se a todos os dados disponíveis, a fim de minimizar a utilização de animais. Por exemplo, os dados gerados em aplicação do capítulo B.52 (4) deste anexo podem dispensar o estudo preliminar e servir para verificar se um dos sexos é mais sensível que o outro [ver o GD 39 (2)].

▼M4

PROTOCOLO TRADICIONAL

Considerações gerais: protocolo tradicional

27. No estudo tradicional, expõem-se grupos de animais ao produto químico em estudo, durante um período fixo (geralmente quatro horas), numa câmara de exposição unicamente nasal ou de corpo inteiro. Os animais são expostos a uma concentração-limite (ensaio do limite) ou, num processo sequencial, a, pelo menos, três concentrações (estudo principal). O estudo principal pode ser antecedido de um estudo preliminar, a menos que já se disponha de determinadas informações sobre o produto químico, tais como as provenientes de um estudo B.52 já realizado [ver o GD 39 (2)].

Estudo preliminar: protocolo tradicional

28. Recorre-se a um estudo preliminar para estimar a potência do produto químico, identificar diferenças de sensibilidade entre sexos e facilitar a escolha dos níveis de concentração de exposição para o estudo principal ou o ensaio do limite. Ao selecionar os níveis de concentração para o estudo preliminar, deve atender-se a todos os dados disponíveis, nomeadamente dados relativos a produtos químicos similares e dados (Q)SAR eventualmente disponíveis. A cada concentração, expõem-se, no máximo, três machos e três fêmeas (podem ser necessários três animais por sexo para determinar uma diferença de sensibilidade entre sexos). O estudo preliminar pode incidir apenas numa concentração, mas podem ser ensaiadas mais se for necessário. Neste estudo não devem ensaiar-se tantos animais e concentrações como num estudo principal. Em vez do estudo preliminar, pode recorrer-se a um estudo B.52 (4) efetuado anteriormente [ver o GD 39 (2)].

Ensaio do limite: protocolo tradicional

29. Efetua-se este ensaio caso se saiba ou preveja que o produto químico em estudo é praticamente não tóxico, isto é, só induzirá toxicidade acima da concentração-limite prevista na regulamentação aplicável. No ensaio do limite, expõe-se a uma concentração-limite do produto químico em estudo um único grupo de três machos e três fêmeas. Podem obter-se informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo a partir de ensaios já realizados com produtos químicos semelhantes, tomando em consideração a identidade e percentagem dos componentes de importância toxicológica reconhecida. Nos casos em que se disponha de pouca ou nenhuma informação sobre a toxicidade do produto químico em estudo ou quando este for previsivelmente tóxico, deve efetuar-se o estudo principal.

30. A escolha das concentrações-limite depende geralmente da regulamentação aplicável. Quando se trata do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, as concentrações-limite aplicáveis são 20 000 ppm para gases, 20 mg/l para vapores e 5 mg/l para aerossóis (ou a concentração máxima atingível) (3). Pode ser tecnicamente difícil gerar as concentrações-limite no caso de determinados produtos químicos, em especial quando se trata de vapores ou de aerossóis. Ao ensaiar aerossóis, o principal objetivo é conseguir obter partículas de dimensões respiráveis (MMAD compreendido entre 1 μm e 4 μm), o que, com a maior parte dos produtos químicos, se consegue a uma concentração de 2 mg/l. Só deve tentar-se ensaiar aerossóis a concentrações superiores a 2 mg/l se for possível gerar partículas de dimensões respiráveis [ver o GD 39 (2)]. Por razões de bem-estar animal, o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (3) desaconselha o ensaio de concentrações superiores à concentração-limite. Só importa ponderar o ensaio da concentração-limite se for elevada a probabilidade de os resultados desse ensaio terem interesse direto para a proteção da saúde humana (3), o que deve justificar-se no relatório do estudo. No caso de produtos químicos potencialmente explosivos, devem tomar-se precauções para evitar condições favoráveis à ocorrência de explosões. Para evitar a utilização desnecessária de animais, deve efetuar-se um ensaio sem animais antes do ensaio do limite, para verificar se é possível atingir as condições deste ensaio nas câmaras.

▼M4

31. Se a concentração-limite gerar mortalidade ou animais moribundos, os resultados do ensaio do limite podem servir de estudo preliminar para os ensaios seguintes a outras concentrações (ver o estudo principal). Se as propriedades físicas ou químicas do produto químico em estudo impossibilitarem que se atinja a concentração-limite, deve ensaiar-se a concentração máxima que se consiga atingir. Se a letalidade verificada à concentração máxima atingível for inferior a 50 %, não são necessários mais ensaios. Se não for possível atingir as concentrações-limite devem constar do relatório do estudo uma explicação disso e dados corroborantes. Se a concentração máxima atingível de um vapor não induzir toxicidade, pode ser necessário gerar o produto químico em estudo sob a forma de um aerossol de líquido.

Estudo principal: protocolo tradicional

32. Num estudo principal utilizam-se, normalmente, cinco machos e cinco fêmeas (ou cinco animais do sexo sensível, se for conhecido) por nível de concentração, sendo que o número mínimo de níveis é três. O número de níveis de concentração utilizado deve permitir efetuar uma análise estatística sólida. O intervalo de tempo entre a exposição dos diversos grupos é determinado pelo aparecimento, pela duração e pela intensidade dos sinais de toxicidade observados. Não se expõem animais ao nível de concentração seguinte enquanto não houver um grau razoável de confiança na sobrevivência dos últimos animais expostos. O diretor do estudo pode, então, ajustar a concentração visada para o próximo grupo a expor. Dada a dependência de tecnologias sofisticadas, este procedimento nem sempre será possível nos estudos por inalação, pelo que a exposição de animais ao nível de concentração seguinte deve basear-se na experiência adquirida e numa apreciação científica. Ao ensaiar misturas, deve consultar-se o documento GD 39 (2).

PROTOCOLO "CONCENTRAÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO" (C × t)

Considerações gerais: Protocolo C × t

33. Na avaliação da toxicidade por inalação, um estudo sequencial C × t pode constituir alternativa ao protocolo tradicional (12)(13)(14). Neste método, Os animais são expostos durante diversos períodos a várias concentrações do produto químico em estudo. Todos os ensaios são efetuados numa câmara de exposição unicamente nasal, pois as câmaras de corpo inteiro não se prestam a este protocolo. O procedimento sequencial descrito no apêndice 1 ilustra este protocolo. Uma análise de simulação mostrou que tanto o protocolo tradicional como o protocolo C × t podem gerar valores fiáveis de CL_{50}, embora este último seja geralmente melhor para obter valores fiáveis de CL_{01} e CL_{10} (15).

34. Uma análise de simulação demonstrou que é geralmente adequado utilizar dois animais por ponto (C,t) – um animal de cada sexo, se forem utilizados ambos os sexos, ou dois animais do sexo mais sensível – para ensaiar quatro concentrações e cinco durações de exposição num estudo principal. Em certas circunstâncias, fica ao critério do diretor do estudo utilizar dois ratos de cada sexo em cada ponto (C,t) (15). A utilização de dois animais de cada sexo em cada ponto (C,t) pode reduzir os erros sistemáticos e a variabilidade das estimativas, aumentar a taxa de êxito destas últimas e melhorar a cobertura do intervalo de confiança. Todavia, se a correlação dos dados não for suficiente para possibilitar uma estimativa quando se utiliza um animal de cada sexo ou dois animais do sexo mais sensível, uma quinta concentração de exposição também poderá bastar para o efeito. Para mais orientações sobre o número de animais e as concentrações a utilizar num estudo C × t, consultar o documento GD 39 (2).

▼M4

Estudo preliminar: Protocolo C × t

35. Recorre-se a um estudo preliminar para estimar a potência do produto químico e facilitar a escolha dos níveis de concentração de exposição para o estudo principal. Para selecionar uma concentração inicial adequada para o estudo principal e minimizar o número de animais utilizados, pode ter de se efetuar um estudo preliminar com um máximo de três animais de cada sexo a cada concentração – mais elementos no apêndice III do documento GD 39 (2). Pode ser necessário utilizar três animais de cada sexo para determinar a diferença de sensibilidade entre sexos. Expõem-se estes animais durante um período único de, geralmente, 240 minutos. A viabilidade de se gerarem as atmosferas de ensaio adequadas deve ser avaliada em ensaios técnicos prévios realizados sem animais. Caso se disponha de dados de mortalidade obtidos num estudo B.52 (4), geralmente não é necessário efetuar um estudo preliminar. Para selecionar a concentração inicial visada num estudo B.2, o diretor do estudo deve atender aos perfis de mortalidade observados a todas as concentrações ensaiadas nos estudos B.52 (4) realizados com ambos os sexos de cujos resultados disponha [ver o GD 39 (2)].

Concentração inicial: protocolo C × t

36. A concentração inicial (sessão de exposição I no apêndice 1) é uma concentração-limite ou uma concentração escolhida pelo diretor do estudo com base no estudo preliminar. Expõem-se grupos de um animal de cada sexo a esta concentração durante diversos períodos (por exemplo, 15, 30, 60, 120 ou 240 minutos), num total de dez animais (sessão de exposição I no apêndice 1).

37. A escolha das concentrações-limite depende geralmente da regulamentação aplicável. Quando se trata do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, as concentrações-limite aplicáveis são 20 000 ppm para gases, 20 mg/l para vapores e 5 mg/l para aerossóis (ou a concentração máxima atingível) (3). Pode ser tecnicamente difícil gerar as concentrações-limite no caso de determinados produtos químicos, em especial quando se trata de vapores ou de aerossóis. Ao ensaiar aerossóis, o objetivo é conseguir obter partículas de dimensões respiráveis (MMAD compreendido entre 1 μm e 4 μm) na concentração-limite de 2 mg/l, o que é possível no caso da maior parte dos produtos químicos. Só deve tentar-se ensaiar aerossóis a concentrações superiores a 2 mg/l se for possível gerar partículas de dimensões respiráveis [ver o GD 39 (2)]. Por razões de bem-estar animal, o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (3) desaconselha o ensaio de concentrações superiores à concentração-limite. Só importa ponderar ensaios a concentrações superiores a essa concentração se for elevada a probabilidade de os resultados desses ensaios terem interesse direto para a proteção da saúde humana (3), o que deve justificar-se no relatório do estudo. No caso de produtos químicos potencialmente explosivos, devem tomar-se precauções para evitar condições favoráveis à ocorrência de explosões. Para evitar a utilização desnecessária de animais, deve efetuar-se um ensaio sem animais antes de ensaiar a concentração inicial, para verificar se é possível atingir nas câmaras as condições correspondentes a essa concentração.

38. Se a concentração inicial gerar mortalidade ou animais moribundos, os resultados obtidos para esta concentração podem servir de ponto de partida para os ensaios seguintes a outras concentrações (ver o estudo principal). Se as propriedades físicas ou químicas do produto químico em estudo impossibilitarem que se atinja a concentração-limite, deve ensaiar-se a concentração máxima que se consiga atingir. Se a letalidade verificada à concentração máxima atingível for inferior a 50 %, não são necessários mais ensaios. Se não for possível atingir a concentração-limite, devem constar do relatório do estudo uma explicação disso e dados corroborantes. Se a concentração máxima atingível de um vapor não induzir toxicidade, pode ser necessário gerar o produto químico em estudo sob a forma de um aerossol de líquido.

▼M4

Estudo principal: protocolo C × t

39. A concentração inicial (sessão de exposição I no apêndice 1) ensaiada no estudo principal é uma concentração-limite ou uma concentração escolhida pelo diretor do estudo com base no estudo preliminar. Se for observada mortalidade durante ou após a sessão de exposição I, deve tomar-se a exposição mínima (C × t) que gera mortalidade como orientação para determinar a concentração e os períodos de exposição para a sessão de exposição II. Cada sessão de exposição subsequente dependerá da sessão que a precede (ver o apêndice 1).

40. No caso de muitos produtos químicos, os resultados obtidos para a concentração inicial, juntamente com os resultados obtidos em três sessões de exposição suplementares menos espaçadas (sendo este espaçamento dado pelo fator que define a série geométrica de períodos de exposição, geralmente $\sqrt{2}$) são suficientes para estabelecer a relação entre C × t e a mortalidade (15), mas pode ser vantajoso utilizar uma quinta concentração de exposição – ver o apêndice 1 e o documento GD 39 (2). O apêndice 1 explica o tratamento matemático dos resultados do protocolo C × t.

EXAMES

41. Os animais devem ser examinados clinicamente com frequência durante o período de exposição. Depois desta, deve efetuar-se um exame clínico pelo menos duas vezes no dia da exposição – ou mais vezes, quando a resposta dos animais à exposição o aconselhar – e pelo menos uma vez por dia em seguida, durante 14 dias. Não é fixada uma duração do período de observação, que deve depender da natureza e do momento do aparecimento de sinais clínicos, assim como da duração do período de recuperação. O momento do aparecimento e do desaparecimento dos sinais de toxicidade é importante, nomeadamente se houver uma certa demora na manifestação desses sinais. Todas as observações devem ser sistematicamente registadas, mantendo registos individuais para cada animal. Os animais moribundos ou que apresentem sinais de dor intensa e/ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados, por razões de bem-estar animal. No exame clínico de sinais de toxicidade, não devem confundir-se um mau aspeto inicial e alterações respiratórias passageiras, imputáveis ao procedimento de exposição, com sinais de toxicidade do produto químico em estudo passíveis de aconselhar a eutanásia prematura dos animais. Devem ser tidos em conta (7) os princípios e critérios resumidos no documento de orientações n.º 19 da OCDE (GD 19). Se forem eutanasiados animais ou forem encontrados animais mortos, deve registar-se o momento da morte com a maior exatidão possível.

42. Os exames a efetuar aos animais engaiolados devem incidir, nomeadamente, nas alterações da pele e da pelagem, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do sistema circulatório, dos sistemas nervosos autónomo e central, da atividade somatomotora e do comportamento. Se possível, registar as diferenças eventualmente observadas entre efeitos locais e sistémicos. Deve estar-se atento a tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. A medição da temperatura retal pode corroborar uma bradipneia reflexa ou uma hipo/hipertermia relacionadas com a exposição ou com o confinamento.

Peso corporal

43. Regista-se o peso de cada animal uma vez durante o período de aclimatação, no dia da exposição, antes desta (dia 0), e, pelo menos, nos dias 1, 3 e 7 (e posteriormente uma vez por semana), bem como no momento da morte ou da eutanásia, se posterior ao dia 1. O peso corporal é reconhecidamente um indicador crítico de toxicidade, pelo que é necessário observar atentamente os animais cujo peso decresça 20 % ou mais relativamente ao peso anterior ao estudo e não volte a aumentar. No final do período após a exposição, pesam-se e eutanasiam-se os animais sobreviventes.

▼M4

Patologia

44. Os animais utilizados nos ensaios (incluindo os que morrerem durante o ensaio ou que forem eutanasiados e retirados do estudo por razões de bem-estar animal) devem ser sujeitos a uma autópsia macroscópica. Se não for possível realizar a autópsia imediatamente depois de detetada a morte do animal, este deve ser refrigerado (não congelado) a uma temperatura suficientemente baixa para minimizar a autólise. As autópsias devem ser efetuadas o mais rapidamente possível, normalmente não mais de um ou dois dias após a morte. Regista-se todas as alterações patológicas macroscópicas de cada animal, prestando especial atenção às alterações do aparelho respiratório.

45. Podem ser efetuados outros exames previamente previstos para alargar o valor interpretativo do estudo, tais como a pesagem dos pulmões dos ratos sobreviventes e/ou a pesquisa, por exame microscópico, de irritações do aparelho respiratório. Também podem examinar-se os órgãos que evidenciem macropatologias de animais que tenham sobrevivido 24 horas ou mais, bem como órgãos que se saiba serem afetados ou que se preveja serem-no. O exame microscópico de todo o aparelho respiratório pode fornecer elementos úteis no caso dos produtos químicos que reagem com a água, tais como os ácidos e os produtos químicos higroscópicos.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

46. Devem ser indicados o peso corporal e os resultados da autópsia de cada animal. Devem ser resumidos os resultados dos exames clínicos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentaram sinais específicos de toxicidade, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados e o momento da morte de cada animal, complementados por uma descrição dos efeitos tóxicos e da evolução e reversibilidade destes, bem como pelos resultados das autópsias.

Relatório dos ensaios

47. Elementos a constar, quando pertinente, do relatório dos ensaios:

Animais estudados e condições em que são mantidos

— descrição das condições de engaiolamento, nomeadamente: número (ou alteração do número) de animais por gaiola, camas, temperatura e humidade relativa ambientes, fotoperíodo e dieta,

— espécie e estirpe utilizadas e, caso não sejam utilizados ratos, justificação da utilização de outra espécie,

— número, idade e sexo,

— método de aleatorização,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— descrição de eventuais condicionamentos anteriores ao ensaio, nomeadamente ao nível da dieta, de quarentenas e do tratamento de doenças.

▼M4

Produto químico em estudo

— natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas pertinentes (incluindo a isomerização),

— dados de identificação e, se for conhecido, número de registo CAS (*Chemical Abstract Service*).

Veículo

— justificação da utilização e da escolha do veículo (se não for água),

— dados históricos ou paralelos demonstrativos de que o veículo não interfere nos resultados do estudo.

Câmaras de inalação

— descrição – incluindo dimensões e volume – das câmaras de inalação,

— origem e descrição do equipamento utilizado na exposição dos animais e na geração da atmosfera,

— equipamento de medição da temperatura, humidade, granulometria e concentração real,

— fonte de ar, tratamento do ar fornecido/evacuado e sistema de climatização utilizado,

— métodos utilizados para calibrar o equipamento a fim de garantir a homogeneidade da ensaiada,

— subpressão ou sobrepressão,

— pontos de exposição por câmara (de exposição unicamente nasal); localização dos animais no sistema (câmara de exposição de corpo inteiro),

— homogeneidade/estabilidade no tempo da atmosfera ensaiada,

— localização nas câmaras dos sensores térmicos e higrométricos e dos pontos de colheita de amostras da atmosfera ensaiada,

— caudais de ar, caudal de ar em cada ponto de exposição (exposição unicamente nasal) ou relação entre o volume ocupado pelos animais e o volume da câmara (câmaras de exposição de corpo inteiro),

— informações sobre o equipamento eventualmente utilizado para medir o oxigénio e o dióxido de carbono,

— tempo necessário para as câmaras de inalação atingirem o equilíbrio (t_{95}),

— número horário de substituições de volume,

— medidores (se existirem).

Elementos relativos à exposição

— fundamentação da escolha da concentração visada no estudo principal,

— concentrações nominais (dadas pela divisão da massa do produto químico em estudo introduzido na câmara de inalação pelo volume de ar total que nela circulou),

— concentrações reais do produto químico em estudo obtidas na zona de respiração dos animais; no caso das misturas que geram formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerossóis), pode analisar-se separadamente cada uma delas,

▼M4

— as concentrações no ar devem ser indicadas em unidades de massa (mg/l, mg/m^3, etc.), podem igualmente indicar-se unidades de volume (ppm, ppb, etc.) entre parêntesis,

— distribuição granulométrica, diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) e desvio-padrão geométrico (σ_g), incluindo os métodos de cálculo correspondentes; indicar também o resultado de cada análise granulométrica efetuada.

Condições de realização dos ensaios

— elementos sobre a preparação do produto químico estudado, nomeadamente sobre eventuais métodos de redução da granulometria de sólidos ou de preparação de soluções do produto químico. Se o recurso a processos mecânicos for passível de ter alterado a composição do produto químico em estudo, incluir os resultados das análises efetuadas para verificar a composição deste,

— descrição (de preferência complementada por um esquema) do equipamento utilizado para gerar a atmosfera ensaiada e para expor os animais a essa atmosfera,

— elementos sobre o método de análise química utilizado e sobre a validação desse método (incluindo o rendimento da recuperação do produto químico em estudo do meio amostrado),

— fundamentação da escolha das concentrações utilizadas nos ensaios.

Resultados

— quadro com a temperatura, a humidade e o caudal de ar nas câmaras,

— quadro com as concentrações nominais e reais nas câmaras,

— quadro com os dados granulométricos, nomeadamente dados analíticos sobre a colheita de amostras, a distribuição granulométrica e os cálculos de MMAD e σ_g,

— quadro com os dados de resposta e as concentrações correspondentes a cada animal (animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, com indicação da natureza, da intensidade, do momento do aparecimento e da duração dos efeitos),

— pesos corporais de cada animal registados durante o estudo; data e momento da morte, se anterior à eutanásia programada; aparecimento, evolução e eventual reversibilidade de sinais de toxicidade em cada animal,

— resultados da autópsia e resultados histopatológicos correspondentes a cada animal, se disponíveis,

— estimativas de letalidade (por exemplo, CL_{50} e DL_{01}), incluindo os intervalos de confiança a 95 % e o declive (se o método de avaliação o previr),

— relação estatística, incluindo uma estimativa do expoente "n" (protocolo C × t). Indicar também o nome do *software* estatístico utilizado.

▼M4

Discussão e interpretação dos resultados

— deve ser dada especial atenção à descrição dos métodos utilizados para satisfazer os critérios deste método de ensaio, nomeadamente no que respeita à concentração-limite e à granulometria,

— examinar em que medida, com base nos resultados globais, as partículas são respiráveis, em especial se os critérios granulométricos não forem satisfeitos,

— explicar por que razão terá sido necessário eutanasiar animais que apresentavam sinais de dor ou de grande sofrimento continuado, com base nos critérios do documento de orientações n.º 19 da OCDE, relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (8),

— explicar por que razão foram interrompidos ensaios segundo o capítulo B.52 (4) deste anexo para realizar ensaios segundo o método B.2, se assim tiver sucedido,

— a apreciação global do estudo deve incidir igualmente na coerência dos métodos utilizados para determinar as concentrações nominal e real e deve dar conta da relação entre estas concentrações,

— referir a causa provável da morte e o modo de ação predominante (sistémico ou local).

REFERÊNCIAS:

(1) OCDE (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403. OCDE, Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39. OCDE, Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(3) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

(4) Capítulo B.52 deste anexo, "Toxicidade aguda por inalação — Método de classificação de toxicidade aguda".

(5) Capítulo B.40 deste anexo, "Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio da resistência elétrica transcutânea (RET)".

(6) Capítulo B.40.A deste anexo, "Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio em modelos de pele humana".

(7) OCDE (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435. OCDE, Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. OCDE, Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18:321-327.

(10) Phalen R.F. (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques (2nd Edition). Informa Healthcare, New York.

▼M4

(11) Pauluhn J., Thiel A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27:160--167.

(12) Zwart J.H.E., Arts J.M., ten Berge W.F., Appelman L.M. (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 15:278-290.

(13) Zwart J.H.E., Arts J.M., Klokman-Houweling E.D., Schoen E.D. (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. *Inhal. Toxicol.* 2:105-117.

(14) Ten Berge W.F., Zwart A. (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. *J. Haz. Mat.* 21:65-71.

(15) OCDE (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104. OCDE, Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(16) Finney D.J. (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINIÇÃO

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M4

Apêndice 1

Protocolo C × t

1. Na avaliação da toxicidade por inalação, um estudo sequencial de concentração em função do tempo (C × t) pode constituir alternativa ao protocolo tradicional utilizado (12)(13)(14). O protocolo C × t deve ser privilegiado quando a regulamentação aplicável ou critérios científicos exigem o ensaio em animais durante vários períodos, nomeadamente para efeitos de planeamento da resposta a situações de emergência e de ordenamento do território. Este procedimento começa, normalmente, pelo ensaio de uma concentração-limite (sessão de exposição I), expondo os animais ao produto químico em estudo durante cinco períodos diferentes (por exemplo, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos), a fim de obter várias durações de exposição numa mesma sessão (ver a figura 1). Quando se trata do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, as concentrações-limite aplicáveis são 20 000 ppm para gases, 20 mg/l para vapores e 5 mg/l para aerossóis. Estes níveis só podem ser excedidos se assim o exigirem a regulamentação aplicável ou razões científicas (ver o ponto 37 do texto principal do método B.2).

2. Nos casos em que se disponha de pouca ou nenhuma informação sobre a toxicidade do produto químico em estudo, deve efetuar-se um estudo preliminar no qual, geralmente durante 240 minutos, se expõem grupos de não mais de três animais de cada sexo às concentrações visadas escolhidas pelo diretor do estudo.

3. Se, na sessão de exposição I, se ensaiar uma concentração-limite e a mortalidade observada for inferior a 50 %, não são necessários mais ensaios. Se a regulamentação aplicável ou razões científicas exigirem que seja determinada a relação entre a concentração, o tempo de exposição e a resposta a esta última a níveis superiores à concentração-limite indicada, a exposição seguinte deve ser efetuada a uma concentração superior, por exemplo, dupla daquela (2L na figura 1).

4. Se for observada toxicidade à concentração-limite, são necessários ensaios complementares (estudo principal). Essas exposições adicionais são efetuadas a concentrações inferiores (sessões de exposição II, III ou IV' na figura 1) ou a concentrações superiores com tempos de exposição mais curtos (sessão de exposição IV na figura 1), adaptados e não tão espaçados.

5. Efetua-se o ensaio (concentrações inicial e seguintes) com um animal de cada sexo por ponto (C,t) ou com dois animais do sexo mais sensível por ponto (C,t). Em determinadas circunstâncias, fica ao critério do diretor do estudo utilizar dois ratos de cada sexo por ponto (C,t) – ou quatro animais do sexo mais sensível por ponto (C,t) (15). A utilização de dois animais de cada sexo por cada ponto (C,t) normalmente reduz os erros sistemáticos e a variabilidade das estimativas, aumenta a taxa de êxito destas últimas e melhora a cobertura do intervalo de confiança, comparativamente ao protocolo aqui descrito. Para mais informações, consultar o documento GD 39 (2).

6. O ideal é efetuar cada sessão de exposição no seu dia. Este procedimento permite adiar a exposição seguinte até existir um grau razoável de confiança na sobrevivência dos animais e possibilita que o diretor do estudo adapte a concentração visada e os tempos de exposição para a sessão seguinte. Recomenda-se começar cada sessão de exposição pelo grupo que será exposto durante mais tempo — no exemplo dado, pelo grupo de 240 minutos de exposição, seguindo-se o grupo de 120 minutos e assim por diante. Se, por exemplo, após 90 minutos, os animais do grupo de 240 minutos estiverem a morrer ou revelarem sinais de toxicidade intensos (por exemplo, alterações extremas da respiração, nomeadamente dificuldades respiratórias), não fará sentido expor um grupo durante 120 minutos, pois a mortalidade dos animais seria provavelmente de 100 %. Nessas circunstâncias, o diretor do estudo deverá selecionar tempos de exposição mais curtos para a concentração em causa (por exemplo, 90, 65, 45, 33 e 25 minutos).

▼M4

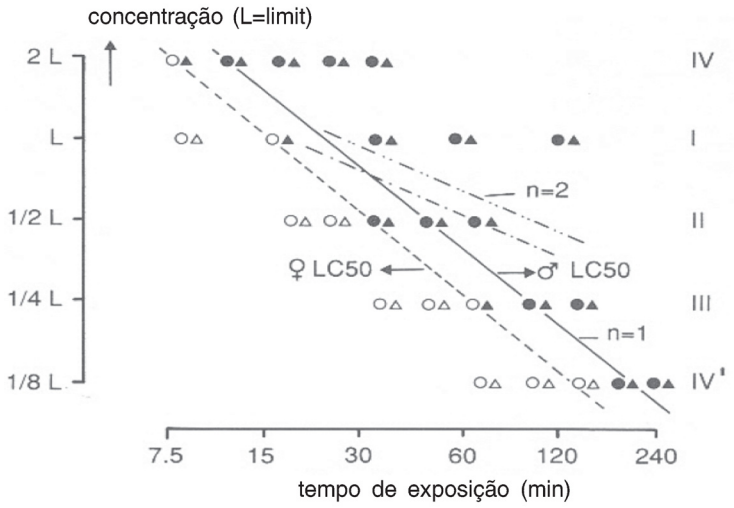
7. Deve medir-se com frequência a concentração na câmara, para determinar a concentração média no tempo para cada duração de exposição. Se possível, deve utilizar-se na análise estatística o momento da morte de cada animal, não a duração da exposição.

8. Uma vez efetuadas as quatro primeiras sessões de exposição, examinam-se os resultados obtidos para verificar se definem suficientemente uma curva da concentração em função do tempo (ver a figura 1). Se isso não acontecer, pode efetuar-se uma exposição suplementar (5.ª concentração). A concentração e os tempos de exposição utilizados na 5.ª exposição devem ser escolhidos de forma a obter os dados em falta.

9. Utilizam-se todas as sessões de exposição (incluída a primeira) para calcular a relação entre a concentração, o tempo de exposição e a resposta a esta última por análise estatística (16). Se possível, deve utilizar-se para cada ponto (C,t) a concentração média no tempo e o tempo de exposição até à morte (se ocorrer durante a exposição).

Figura 1

Exemplo hipotético de uma relação entre a concentração, o tempo de exposição e a mortalidade causada no rato



Símbolos só com contorno: animais sobreviventes; símbolos a cheio: animais mortos;

Triângulos: fêmeas; círculos: machos;

Linha a cheio: valores de CL_{50} (7,5 a 240 minutos) correspondentes a machos (n = 1);

Linha a tracejado: valores de CL_{50} (7,5 a 240 minutos) correspondentes a fêmeas (n = 1);

Linhas com tracejado e ponteado: linhas de valores hipotéticos de CL_{50} para machos e fêmeas com n = 2 (12).

Glossário

concentração;

tempo de exposição.

▼M4

10. Exemplo do procedimento sequencial:

Sessão de exposição I — Ensaio à concentração-limite (ver a figura 1)

— Um animal de cada sexo por ponto (C,t); 10 animais no total ([a]);

— Concentração visada ([b]) = concentração-limite;

— Exposição de cinco grupos de animais a esta concentração visada durante 15, 30, 60, 120 e 240 minutos, respetivamente.

↓

Sessão de exposição II ([c]) — Estudo principal

— Um animal de cada sexo por ponto (C,t); 10 animais no total;

— Exposição de cinco grupos de animais a uma concentração mais baixa ([d]) (1/2L), aumentando ligeiramente a duração das exposições (espaçamento de √2; ver a figura 1).

↓

Sessão de exposição III — Estudo principal

— Um animal de cada sexo por ponto (C,t); 10 animais no total;

— Exposição de cinco grupos de animais a uma concentração mais baixa ([d]) (1/4L), aumentando ligeiramente a duração das exposições (espaçamento de √2; ver a figura 1).

↓

Sessão de exposição IV — *Estudo principal*

— Um animal de cada sexo por ponto (C,t); 10 animais no total;

— Exposição de cinco grupos de animais a uma concentração mais baixa ([d]) (1/8 L), aumentando ligeiramente a duração das exposições (espaçamento de √2; ver a figura 1).

↓ ou

([a]) Se não se dispuser de informações sobre a sensibilidade de cada sexo, utilizam-se ratos de ambos os sexos, isto é, um animal de cada sexo para cada concentração. Com base nas informações disponíveis, ou caso durante esta sessão de exposição se verifique que um dos sexos é mais sensível, utilizam-se 10 animais desse sexo – dois animais por ponto (C,t) – a cada concentração no resto do ensaio.

([b]) Quando se trata do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, as concentrações-limite aplicáveis são 20 000 ppm para gases, 20 mg/l para vapores e 5 mg/l para aerossóis. Caso se preveja toxicidade, ou se os resultados do estudo preliminar o aconselharem, devem escolher-se concentrações iniciais mais baixas. Se a regulamentação aplicável o exigir ou razões científicas o aconselharem, podem utilizar-se concentrações maiores.

([c]) Idealmente, não se expõem animais ao nível de concentração seguinte enquanto não houver um grau razoável de confiança na sobrevivência dos últimos animais expostos. O diretor do estudo pode, então, ajustar a concentração visada e os tempos de exposição para a próxima sessão de exposição.

([d]) A dose mínima (C × t) que produz mortalidade no ensaio à concentração inicial (primeira sessão de exposição) utiliza-se como orientação para estabelecer a próxima combinação de concentração e tempos de exposição. Normalmente, reduz-se a concentração a metade (1/2L) e Os animais são expostos durante períodos menos espaçados, distribuídos em série geométrica de fator 1,4 (√2; ver a referência 11) à volta do tempo correspondente à dose letal mínima (t × C) observada na primeira exposição. A figura 1 mostra que, na sessão de exposição I, se observou mortalidade pela primeira vez ao fim de 15 minutos, pelo que os tempos de exposição da sessão II, centrados nos 30 minutos, foram 15, 21 30, 42 e 60 minutos. Depois das duas primeiras exposições, é fortemente recomendado que se representem graficamente os dados conforme se fez na figura 1, verificando se a relação entre a concentração e o tempo define um ângulo de 45 graus (n = 1) ou se a relação entre a concentração, o tempo de exposição e a resposta a esta última tem um declive menor (por exemplo, n = 2) ou maior (por exemplo, n = 0,8). Nestes últimos casos, é fortemente recomendado que se adaptem em conformidade os tempos de exposição e concentrações seguintes.

▼M4

Sessão de exposição IV — Estudo principal

— Um animal de cada sexo por ponto (C,t); 10 animais no total;

— Exposição de cinco grupos de animais a uma concentração mais elevada (e) (2L), diminuindo ligeiramente a duração das exposições (espaçamento de $\sqrt{2}$; ver a figura 1).

Tratamento matemático dos resultados do protocolo C × t

11. O procedimento C × t gerará 20 ou 25 pontos, consoante se utilizem quatro ou cinco concentrações durante cinco períodos de exposição. Com base nesses pontos, pode calcular-se a relação C × t recorrendo à seguinte análise estatística (16):

Equação 1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

em que C é a concentração e t é o tempo de exposição; ou

Equação 2:

$$Resposta = f(C^n t)$$

em que $n = b_1/b_2$.

Recorrendo à equação 1, pode calcular-se o valor de CL_{50} correspondente a um determinado período (por exemplo, 4 h, 1 h, 30 minutos ou qualquer outro período da gama de tempos de exposição ensaiados) utilizando P = 5 (50 % de resposta). De notar que a regra de Haber só se aplica se n = 1. Pode calcular-se a CL_{01} utilizando P = 2,67.

(e) Em determinados casos, pode ser necessário aumentar a concentração (2L) e associar-lhe novos tempos de exposição menos espaçados, distribuídos em série geométrica de fator 1,4 ($\sqrt{2}$) à volta do tempo correspondente à concentração letal mínima observada na primeira exposição. É preferível que a duração mínima da exposição seja superior a cinco minutos, não devendo a duração máxima exceder 8 horas.

▼B

B.3. **TOXICIDADE AGUDA (DÉRMICA)**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B (ponto A).

1.2. DEFINIÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B (ponto B).

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhumas.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Aplica-se a substância de ensaio sobre a pele de diversos grupos de animais de experiência, em doses graduadas, utilizando-se uma dose por grupo. Subsequentemente, procede-se à observação dos efeitos e das mortes ocorridas. Os animais que morrem durante o ensaio são submetidos a autópsia e no fim do ensaio os animais sobreviventes são também submetidos a autópsia.

Pode ser necessário sacrificar os animais que apresentem manifestações graves e permanentes de angústia e dor. Não se deve dosear as substâncias de ensaio de uma forma que se saiba provocar dor acentuada e angústia devido às suas propriedades corrosivas ou irritantes.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Nenhum.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Preparativos**

Os animais são mantidos nas suas gaiolas sob condições de alimentação e alojamento experimentais durante pelo menos cinco dias antes da experiência. Antes do ensaio os animais adultos jovens e saudáveis são seleccionados aleatoriamente e distribuídos por grupos de tratamento. Aproximadamente 24 horas antes do ensaio deve remover-se o pêlo da região dorsal dos animais, tosquiando-o ou rapando-o. Ao tosquiar ou ao rapar o pêlo é necessário tomar precauções para evitar lesões da pele que possam alterar a sua permeabilidade. A área destinada à aplicação da substância de ensaio não poderá ser inferior a 10 % da superfície corporal. Sempre que se procede ao ensaio de substâncias sólidas, as quais podem ser pulverizadas quando necessário, a substância de ensaio deve ser humedecida com água ou com um veículo apropriado para garantir um bom contacto com a pele. No caso de se utilizar um veículo, deve tomar-se em consideração a influência desse veículo relativamente à penetração da substância de ensaio na pele. Geralmente utilizam-se as substâncias de ensaio líquidas não diluídas.

1.6.2. **Condições de ensaio**

1.6.2.1. *Animais de experiência*

Pode ser utilizado o rato ou o coelho. Podem ser utilizadas outras espécies sendo necessário justificar a sua utilização. Devem utilizar-se as estirpes vulgarmente utilizadas em laboratório. Para cada sexo, no início do ensaio, o intervalo de variação do peso para os animais utilizados não deverá exceder ± 20 % do valor médio apropriado.

▼B

1.6.2.2. *Número e sexo*

Utilizam-se pelo menos cinco animais para cada dose. Devem ser todos do mesmo sexo. No caso de se utilizar fêmeas estas devem ser nulíparas e não devem estar grávidas. No caso de existir informação disponível demonstrando que um dos sexos é nitidamente mais sensível, deve fazer-se a administração das doses aos animais desse sexo.

Nota: Nos ensaios de toxicidade aguda com animais de uma ordem superior à dos roedores deve levar-se em consideração a possibilidade de utilizar um menor número de animais. As doses deverão ser seleccionadas cuidadosamente e deverão ser feitos todos os esforços possíveis para não exceder as doses moderadamente tóxicas. Nestes ensaios deve evitar-se a administração de doses letais da substância de ensaio.

1.6.2.3. *Doses*

Estas devem ser em número suficiente, pelo menos três, e adequadamente espaçadas para originarem grupos de ensaio com uma diversidade de efeitos tóxicos e de taxas de mortalidade. Ao tomar-se a decisão sobre as doses deve levar-se em consideração quaisquer efeitos irritantes ou corrosivos. Os dados deverão ser suficientes para permitirem traçar uma curva dose/resposta e, sempre que possível, uma determinação aceitável do valor DL_{50}.

1.6.2.4. *Teste limite*

Pode efectuar-se um teste limite com uma dose de pelo menos 2 000 mg/kg de peso do corpo num grupo de cinco machos e de cinco fêmeas utilizando os procedimentos anteriormente descritos. No caso de se observar mortalidade associada ao composto é necessário considerar a hipótese de realizar um estudo completo.

1.6.2.5. *Período de observação*

O período de observação deve ser de pelo menos 14 dias. Contudo o período de duração da observação não deve ser fixo rigidamente. Deve ser determinado pelas reacções tóxicas, o momento de aparecimento de sintomas e a duração do período de recuperação; em consequência, pode ser prolongado quando se considerar necessário. O momento em que as manifestações de toxicidade aparecem e desaparecem e o momento da morte são importantes, especialmente se existir uma tendência para retardar as mortes.

1.6.3. **Procedimento**

Os animais serão colocados em gaiolas individuais. A substância de ensaio será aplicada uniformemente numa área aproximadamente 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.

A substância de ensaio deve ser mantida em contacto com a pele por meio de uma gaze porosa e de um adesivo antialérgico, durante um período de exposição de 24 horas. A superfície tratada será por sua vez convenientemente coberta de maneira a manter no seu lugar a gaze e a substância de ensaio e de modo a evitar que os animais ingiram a substância. Podem ser utilizados aparelhos de contenção para evitar a ingestão da substância mas não se recomenda a imobilização completa,

▼B

No fim do período de exposição é necessário eliminar todos os resíduos da substância, se possível, utilizando água ou qualquer outro meio adequado para limpeza da pele.

As observações devem ser feitas e registadas sistematicamente. São feitas fichas individuais para cada animal. As observações deverão ser efectuadas com frequência regular durante o primeiro dia. Deve efectuar-se um exame clínico cuidadoso pelo menos uma vez durante cada dia de trabalho, e deverão ser efectuadas outras observações diariamente tomando-se acções apropriadas para minimizar as perdas de animais submetidos a estudo, por exemplo, efectuar-se-á a autópsia ou a refrigeração dos animais encontrados mortos e efectuar-se-á o isolamento ou o sacrifício dos animais fracos ou moribundos.

As observações deverão incluir as modificações do pêlo, pele tratada, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do aparelho circulatório, do sistema nervoso autónomo e central, bem como a actividade somatomotora e do comportamento. Deve prestar-se particular atenção à observação de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. O momento da morte deve ser registado com uma exactidão tão grande quanto possível. Os animais que morrem durante o ensaio e os que sobrevivem até ao fim do ensaio são submetidos a autópsia. Deverão ser registadas todas as modificações patológicas. Sempre que for aconselhável deverão ser preparadas amostras dos tecidos para exame histopatológico.

Avaliação da toxicidade no outro sexo

Depois de se ter completado o estudo relativamente a um dos sexos, submete-se a ensaio pelo menos um grupo de cinco animais do sexo oposto para se verificar se os animais desse sexo não são nitidamente mais sensíveis à substância de ensaio. Em circunstâncias individuais pode justificar-se a utilização de menos animais. No caso de existir informação adequada disponível suficiente para demonstrar que os animais do sexo testado são nitidamente mais sensíveis, é dispensável proceder a ensaios com animais do outro sexo.

2. RESULTADOS

Os resultados deverão ser resumidos em quadros indicando-se para cada grupo de experiência o número de animais no início do teste, o momento da morte de cada animal, o número de animais que exibem outras manifestações de toxicidade, a descrição dos efeitos tóxicos e os resultados da autópsia. Os pesos de cada animal deverão ser determinados e registados imediatamente antes da administração da substância de ensaio, decorrida uma semana e no momento da morte; as variações de peso deverão ser calculadas e registadas quando o período de sobrevivência exceder um dia. Procede-se ao registo dos animais que tiverem que ser sacrificados devido à dor e à angústia provocados pela substância procedendo-se de igual modo para as mortes provocadas pela substância. O valor DL_{50} pode ser determinado por um método reconhecido.

A avaliação dos resultados deverá incluir a relação, se existir, entre a exposição dos animais à substância de ensaio e a incidência e gravidade de todas as anormalidades, incluindo as anomalias de comportamento e clínicas, as lesões graves, as modificações do peso do corpo, a mortalidade e quaisquer outros efeitos toxicológicos.

3. RELATÓRIO

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

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

▼B

— espécies, estirpe, origem, condições ambientais, dieta, etc.,

— condições experimentais (incluindo o método de limpeza da pele e tipo de gaze: oclusiva ou não oclusiva),

— níveis de dosagem (com veículo, no caso de este ser utilizado, e as concentrações),

— sexo dos animais submetidos à experiência,

— quadros com os dados de resposta por sexo e por valores de dosagem (isto é, número de animais que morreram ou que foram sacrificados durante os ensaios, número de animais que apresentam manifestações de toxicidade, número de animais expostos),

— momento da morte após a administração da dose, razões e critérios utilizados para o sacrifício dos animais,

— todas as observações,

— valor DL_{50} para o grupo do sexo submetido ao estudo completo ao longo do período de 14 dias (especificando-se o método de determinação),

— intervalo de confiança a 95 % para o valor DL_{50} (no caso de ser possível obter esse valor),

— curva dose/mortalidade e seu declive (no caso de isto ser possível com o método de determinação),

— resultados da autópsia,

— quaisquer resultados das observações histopatológicas,

— resultados de qualquer ensaio efectuado sobre o outro sexo,

— discussão dos resultados (deve prestar-se particular atenção ao efeito que o sacrifício dos animais durante o ensaio pode ter sobre o valor DL_{50} calculado),

— interpretação dos resultados.

3.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B (ponto D).

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução Geral, parte B (ponto E).

▼B

B.4. TOXICIDADE AGUDA: IRRITAÇÃO/CORROSÃO DÉRMICA

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 404 (2002) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

Na preparação do presente método optimizado foi dada especial atenção aos possíveis melhoramentos através da avaliação de toda a informação já existente sobre a substância de ensaio, de modo a evitar testes desnecessários em animais de laboratório e assim ter em consideração a problemática da protecção dos animais. O presente método inclui a recomendação de se levar a cabo uma análise da importância das provas de todos os dados relevantes existentes antes de se efectuar o ensaio *in vivo* descrito para irritação/corrosão pela substância. No caso de não se encontrarem disponíveis dados suficientes, estes podem ser obtidos através da aplicação de ensaios sequenciais (1). A estratégia de ensaio recomendada inclui a execução de ensaios *in vitro* validados e aceites e é fornecida como anexo ao presente método. Além disso, quando for apropriado, recomenda-se a aplicação sucessiva (não simultânea) de três pensos de ensaio ao animal no ensaio *in vivo* inicial.

Tendo em consideração o interesse científico e a protecção dos animais, não devem ser efectuados ensaios *in vivo* até se proceder a uma avaliação de todos os dados disponíveis relevantes à potencial corrosibilidade/irritabilidade dérmica de uma substância mediante uma análise de importância das provas. Os dados devem incluir resultados de estudos em humanos e/ou animais de laboratório, provas de corrosibilidade/irritabilidade de uma ou mais substâncias estruturalmente relacionadas, ou de misturas dessas substâncias, dados que demonstrem elevada acidez ou alcalinidade da substância (2) (3) e resultados de ensaios *in vitro* ou *ex vivo* validados e aceites (4) (5) (5a). Esta análise deve reduzir a necessidade de ensaios *in vivo* da corrosibilidade/irritabilidade dérmica de substâncias para as quais já existem dados suficientes provenientes de outros estudos em relação a estes dois factores.

Junta-se em anexo ao presente método uma estratégia de ensaio sequencial preferível, que inclui a execução de ensaios validados e aceites *in vitro* ou *ex vivo* para irritação/corrosão. A estratégia foi desenvolvida num grupo de trabalho (*workshop*) da OCDE (6), no qual foi recomendada por unanimidade dos participantes, tendo sido adoptada como estratégia de ensaio recomendada pelo sistema harmonizado a nível mundial para a classificação de substâncias químicas (GHS) (7). Apesar de esta estratégia de ensaio sequencial não ser parte integrante do método de ensaio B.4, recomenda-se que a mesma seja adoptada antes da realização de ensaios *in vivo.* No caso de novas substâncias recomenda-se uma metodologia de ensaio por etapas para a obtenção de dados científicos sobre a corrosibilidade/irritabilidade da substância. No caso de substâncias já existentes, mas cujos dados insuficientes sobre irritação/corrosão dérmica são insuficientes, recomenda-se a adopção desta estratégia para a obtenção dos dados em falta. Caso se opte por uma estratégia ou procedimento de ensaio diferente ou se decida não aplicar uma metodologia de ensaio por etapas, deve apresentar-se uma justificação para a opção feita.

Um ensaio *in vivo,* apenas deve ser considerado caso não seja possível determinar a corrosibilidade, ou a irritabilidade, através da análise de importância das provas e de acordo com a estratégia de ensaio sequencial (ver anexo).

▼B

1.2. DEFINIÇÕES

Irritação dérmica: consiste na produção de danos reversíveis na pele após a aplicação da substância de ensaio, por um período não superior a quatro horas.

Corrosão dérmica: consiste na produção de danos irreversíveis na pele — por exemplo, necrose visível através da epiderme e que atinge a derme, após a aplicação de uma substância de ensaio por um período não superior a quatro horas. As reacções corrosivas típicas são úlceras, sangramento, crostas ensanguentadas e, após o período de observação de 14 dias, empalidecimento devido à descoloração da pele, áreas alargadas de alopecia e cicatrizes. Deve ser considerada uma análise histopatológica na avaliação de lesões duvidosas.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância de ensaio é aplicada em dose única na pele de um animal de experiência; as áreas de pele não tratadas do animal de experiência são utilizadas como controlo. O grau de irritação/-corrosão é observado e registado em intervalos determinados e detalhadamente descrito de modo a permitir uma avaliação completa dos efeitos. A duração do estudo deve ser suficiente para avaliar a reversibilidade ou irreversibilidade dos efeitos observados.

Os animais que apresentarem sinais de se encontrarem em grave perigo e/ou apresentarem sinais de dor durante qualquer das etapas do ensaio devem ser abatidos e a substância deve ser classificada de acordo com estas observações. Os critérios para a decisão de abater animais moribundos e animais em grave sofrimento podem ser consultados na referência (8).

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Preparação do ensaio *in vivo***

1.4.1.1. *Selecção de espécies animais*

O coelho albino é o animal de laboratório mais adequado, devendo ser usados coelhos jovens adultos saudáveis. A utilização de outras espécies deve ser justificada.

1.4.1.2. *Preparação dos animais*

Aproximadamente 24 horas antes do ensaio, o pêlo deve ser removido por corte curto da área dorsal do tronco dos animais. Deve ter-se o cuidado de não ferir a pele do animal e só devem ser usados animais com pele saudável e intacta.

Algumas estirpes de coelhos têm tufos densos de pêlo, que são mais proeminentes em certas épocas do ano. Estas áreas de crescimento denso de pêlo não devem ser utilizadas como local de ensaio.

1.4.1.3. *Condições de alojamento e alimentação*

Os animais devem ser alojados individualmente. A temperatura do biotério para os coelhos deve ser de 20ºC (± 3ºC). Embora a humidade relativa deva ser de pelo menos 30 % e de preferência não exceder os 70 %, excepto durante o período de limpezas, o valor pretendido deve ser de 50 %-60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguida de uma de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem ser utilizadas dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

▼B

1.4.2. **Protocolo de ensaio**

1.4.2.1. *Aplicação da substância de ensaio*

A substância de ensaio deve ser aplicada numa pequena área de pele (aproximadamente 6 cm^2) e coberta com um penso de gaze, colado com fita adesiva não irritante. Nos casos em que não é possível aplicação directa (por exemplo, líquidos e algumas pastas), a substância de ensaio deve ser aplicada num penso de gaze, que é, por sua vez, aplicado à pele. Durante o período de exposição, o penso deve estar em contacto com a pele de uma forma ligeiramente solta através de uma ligadura semioclusiva adequada. Se a substância de ensaio for aplicada num penso, este deve ser mantido sobre a pele de modo a assegurar um bom contacto e uma distribuição uniforme da substância na pele. Deve ser evitado o acesso do animal ao penso e a ingestão ou inalação da substância de ensaio.

As substâncias de ensaio líquidas são geralmente utilizadas sem diluição. Quando se ensaiam sólidos (que podem ser pulverizados, caso tal seja considerado necessário), a substância de ensaio deve ser humedecida com a menor quantidade de água (ou, se necessário, com outro excipiente adequado) suficiente para assegurar um bom contacto com a pele. No caso de serem utilizados excipientes que não água, a influência potencial do excipiente na irritação da pele pela substância de ensaio deve ser mínima ou nula.

No final do período de exposição, que é normalmente de quatro horas, a substância de ensaio residual deve ser removida, caso tal seja praticável, utilizando água ou um solvente apropriado, que não altere a resposta ou a integridade da epiderme.

1.4.2.2. *Nível de dosagem*

Aplica-se ao local de ensaio uma dose de 0,5 ml de líquido ou de 0,5 g de sólido ou pasta.

1.4.2.3. *Ensaio inicial (ensaio in vivo de irritação/corrosão dérmica utilizando um animal)*

Recomenda-se vivamente que o ensaio *in vivo* seja efectuado inicialmente utilizando apenas um animal, sobretudo quando se suspeita que a substância é potencialmente corrosiva. Tal procedimento está em conformidade com a estratégia de ensaio sequencial (ver anexo 1).

No caso de uma substância ter sido considerada corrosiva com base numa análise de importância das provas, não são necessários ensaios adicionais em animais. Para a maior parte das substâncias que se suspeite serem corrosivas, não são normalmente necessários ensaios *in vivo* adicionais. No entanto, nos casos em que, devido a insuficiência de provas, se considere necessária a obtenção de dados adicionais, pode ser efectuado um número restrito de ensaios em animais utilizando a seguinte metodologia: aplicação sequencial de até três pensos de ensaio ao animal. O primeiro penso é removido após três minutos. Caso não se observe qualquer reacção grave na pele, aplica-se um segundo penso, que é removido ao fim de uma hora. Se nesta etapa as observações indicarem que se pode aumentar o tempo de exposição para quatro horas em condições não agressivas para o animal, aplica-se um terceiro penso, que é removido após quatro horas, sendo a resposta devidamente graduada.

Caso seja observado um efeito corrosivo após qualquer das três exposições sequenciais, o ensaio é imediatamente finalizado. Caso não se observe qualquer efeito corrosivo após a remoção do último penso, o animal é observado durante 14 dias, excepto se desenvolver corrosão antes do final desse período.

▼B

Nos casos em que a substância de ensaio não seja susceptível de provocar corrosão, mas que possa ser irritante, deve ser aplicado um único penso a um animal durante quatro horas.

1.4.2.4. *Ensaio de confirmação (ensaio in vivo de irritação dérmica com animais adicionais)*

Se não for observado um efeito corrosivo no ensaio inicial, a resposta irritante ou negativa deve ser confirmada utilizando até dois animais adicionais, cada um com um penso e por um período de exposição de quatro horas. Se for observado um efeito irritante no ensaio inicial, o ensaio de confirmação pode ser efectuado de uma forma sequencial ou através da exposição simultânea de dois animais adicionais. No caso excepcional de não ser efectuado um ensaio inicial, podem tratar-se dois ou três animais com um penso único, que é removido quatro horas após a aplicação. No caso de se utilizarem dois animais e ambos apresentarem a mesma resposta, não é necessário efectuar mais ensaios. Caso contrário, o terceiro animal é igualmente ensaiado. Pode ser necessária a utilização de animais adicionais para confirmar respostas equívocas.

1.4.2.5. *Período de observação*

O período de observação deve ter uma duração suficiente para uma avaliação completa da reversibilidade dos efeitos observados. No entanto, a experiência deve ser interrompida em qualquer altura caso o animal apresente sintomas continuados de dor intensa ou de se encontrar em situação de perigo. Para a determinação da reversibilidade dos efeitos, os animais devem ser observados durante 14 dias após a remoção dos pensos. No caso de se observar reversibilidade antes do fim do período de 14 dias, deve interromper-se a experiência.

1.4.2.6. *Observações clínicas e graduação das reacções da pele*

Todos os animais devem ser examinados para sintomas de eritema e edema, sendo as respostas avaliadas aos 60 minutos e às 24, 48 e 72 horas após a remoção do penso. No ensaio inicial com um animal, o local de ensaio é igualmente examinado imediatamente após a remoção do penso. As reacções dérmicas são graduadas e registadas de acordo com a graduação da tabela infra. Caso ocorram danos na pele que não possam ser identificados como irritação ou corrosão após 72 horas, pode ser necessário efectuar observações até ao dia 14 para determinar a reversibilidade dos efeitos. Além da observação de irritação, todos os efeitos tóxicos locais, tais como perda de gordura cutânea e quaisquer efeitos sistémicos adversos (por exemplo, efeitos em sintomas de toxicidade e efeitos no peso corporal), devem ser descritos e registados pormenorizadamente. Poderá ser efectuado um exame histopatológico para clarificar respostas equívocas.

A graduação das respostas dérmicas é necessariamente subjectiva. O pessoal que executa as observações deve ser treinado adequadamente no sistema de graduação utilizado (ver tabela infra) para se promover a harmonização da graduação da resposta dérmica e auxiliar os laboratórios de ensaio e as pessoas envolvidas na obtenção e interpretação das observações. Poderá ser útil a consulta de um guia ilustrado para graduação da irritação dérmica e outras lesões (9).

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os resultados do estudo devem ser resumidos sob a forma de tabela no relatório final de ensaio e devem abranger todos os itens descritos na secção 3.1.

▼B

2.2. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados de irritação dérmica devem ser avaliados conjuntamente com a natureza e a gravidade das lesões e a sua reversibilidade ou ausência de reversibilidade. As respostas individuais não representam um padrão absoluto das propriedades irritantes do material, já que são também avaliados outros efeitos do material de ensaio. Pelo contrário, os resultados individuais devem ser encarados como valores de referência, que necessitam de ser avaliados conjuntamente com todas as outras observações efectuadas durante o estudo.

Deve ser considerada a reversibilidade das lesões dérmicas na avaliação da resposta irritante. Nos casos em que ocorrerem respostas como alopecia (área limitada), hiperqueratose, hiperplasia e descamação persistentes no final do período de 14 dias de observação, a substância de ensaio deve ser considerada irritante.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Fundamentação lógica para o ensaio *in vivo*: análise de importância das provas dos dados de ensaio preexistentes, incluindo os resultados da estratégia de ensaio sequencial:

— descrição dos dados relevantes disponíveis de ensaios anteriores;

— dados obtidos em cada etapa da estratégia de ensaio;

— descrição dos ensaios *in vitro* efectuados, incluindo detalhes sobre o protocolo, resultados obtidos com substâncias de ensaio/-referência;

— análise de importância das provas para a realização do estudo *in vivo*.

Substância de ensaio:

— dados de identificação (por exemplo, número CAS, origem, grau de pureza, impurezas conhecidas, número de lote);

— natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, pH, volatilidade, solubilidade, estabilidade);

— no caso de misturas, composição e percentagens relativas dos componentes.

Excipiente:

— identificação, concentração (quando apropriado), volume utilizado;

— justificação para a escolha do excipiente.

Animais de ensaio:

— espécie/estirpe utilizada, fundamentação lógica para a utilização de outro tipo de animais que não coelhos albinos;

— número de animais de cada sexo;

— peso individual dos animais no início e no final do ensaio;

— idade no início do estudo;

— origem dos animais, condições de alojamento, dieta, etc.

▼B

Condições do ensaio:

— técnica de preparação do local de aplicação do penso;

— descrição pormenorizada dos materiais utilizados no penso e da técnica de aplicação do penso;

— descrição pormenorizada da preparação, aplicação e remoção da substância de ensaio.

Resultados:

— tabelas com a classificação das respostas de irritação/corrosão para cada animal em cada observação;

— descrição de todas as lesões observadas;

— descrição pormenorizada da natureza e grau da irritação ou corrosão observadas e de quaisquer observações histopatológicas;

— descrição de quaisquer outros efeitos adversos locais (por exemplo, perda de gordura cutânea) e efeitos sistémicos, além da irritação ou corrosão dérmica.

Análise dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, p. 410-429.

(2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicology *In Vitro*, 2, p. 19-26.

(3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, p. 709-720.

(4) ECETOC (1990) Monograph No 15, «Skin Irritation», European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, p. 483-524.

(5a) Método de Ensaio B.40. Corrosão dérmica.

(6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://www.oecd1.org/ehs/test/background.htm).

(7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd1.org/ehs/Class/HCL6.htm).

▼B

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No 19 (http://www.oecd1.org/ehs/test/monos.htm).

(9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, *(20T-2004)*. United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

[Disponível no Secretariado da OCDE.]

▼B

Tabela I

GRADUAÇÃO DE REACÇÕES DÉRMICAS

Formação de eritema e escara

Ausência de eritema	0
Eritema muito ligeiro (fracamente discernível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a grave	3
Eritema grave (vermelhidão cor de carne) e formação de escara que impede a graduação do eritema	4

Máximo possível: 4

Formação de edema

Ausência de edema	0
Edema muito ligeiro (fracamente discernível)	1
Edema ligeiro (bordos da área bem definidos por elevação delineada)	2
Edema moderado (com uma elevação de aproximadamente 1 mm)	3
Edema grave (com uma elevação superior a 1 mm e excedendo a área de exposição)	4

Máximo possível: 4

Poderá ser efectuado um exame histopatológico para clarificar respostas equívocas.

▼B

ANEXO

Uma estratégia de ensaio sequencial para a irritação e corrosão dérmica

CONSIDERAÇÕES GERAIS

No sentido de atender aos interesses quer científicos, quer da protecção dos animais, torna-se importante evitar o uso desnecessário de animais e minimizar os ensaios que possam causar reacções graves em animais. Deve ser avaliada toda a informação sobre a substância que seja relevante para a sua potencial capacidade irritante/corrosibilidade dérmica antes de se considerarem os ensaios *in vivo*. É possível que existam já dados suficientes para classificar a substância de ensaio segundo o seu potencial irritante ou corrosivo dérmico, sem necessidade de recorrer a ensaios em animais de laboratório. Assim, a utilização de uma análise de importância das provas e de uma estratégia de ensaio sequencial minimizará a necessidade de ensaios *in vivo,* especialmente no caso de substâncias com elevada probabilidade de produzirem reacções graves.

Recomenda-se a utilização da análise de importância das provas para avaliar a informação existente sobre irritação e corrosão dérmica de substâncias, a fim de determinar a necessidade de se efectuarem estudos adicionais, diferentes dos estudos dérmicos *in vivo,* que sejam úteis para caracterizar o referido potencial. No caso de serem necessários estudos adicionais, recomenda-se a utilização de uma estratégia de ensaio sequencial para a obtenção dos dados experimentais relevantes. No caso de substâncias para as quais não exista nenhuma história de ensaios, deve ser utilizada a estratégia de ensaio sequencial para a obtenção dos dados necessários para avaliar a sua irritação/corrosão dérmica. A estratégia de ensaio descrita no presente anexo foi desenvolvida num grupo de trabalho (*workshop*) da OCDE (1). Foi subsequentemente confirmada e ampliada no sistema harmonizado e integrado de classificação de perigos para a saúde humana e efeitos ambientais de substâncias químicas, tal como foi aprovado pela 28.ª sessão conjunta do comité das substâncias químicas e do grupo de trabalho de substâncias químicas, em Novembro de 1998 (2).

Apesar da presente estratégia de ensaio não fazer parte integrante do método de ensaio B.4, ela expressa a metodologia recomendada para a determinação das características de irritação/corrosão dérmica. Esta metodologia representa não só a melhor prática como também um ponto de referência ético para o ensaio *in vivo* para irritação/corrosão dérmica. O método de ensaio fornece uma orientação para a realização do ensaio *in vivo* e resume os factores que devem ser considerados antes de ponderar a execução deste ensaio. A estratégia fornece uma metodologia para a avaliação dos dados existentes sobre as propriedades de irritação/corrosão dérmica de substâncias de ensaio e uma metodologia em séries para a obtenção de dados relevantes sobre substâncias para as quais sejam necessários estudos adicionais ou não tenham sido efectuados quaisquer estudos. Também se recomenda a realização de ensaios *in vitro* ou *ex vivo* validados e aceites para o estudo de irritação/corrosão dérmica em circunstâncias específicas.

DESCRIÇÃO DA ESTRATÉGIA DE AVALIAÇÃO E ENSAIO

Antes da realização dos ensaios como parte da estratégia de ensaio sequencial (figura), deve ser avaliada toda a informação disponível de modo a determinar a necessidade de realização de ensaios dérmicos *in vivo*. Apesar de ser possível obter informação significativa a partir da avaliação de um só parâmetro (por exemplo, pH extremo), deve ser avaliada a totalidade da informação existente. Para uma decisão baseada na análise da importância das provas, devem ser avaliados todos os dados relevantes sobre os efeitos da substância em causa ou dos seus análogos estruturais, e deve apresentar-se uma justificação fundamentada para a decisão tomada. Deve dar-se especial relevância aos dados existentes sobre a substância relativamente a humanos e animais e, em seguida, aos resultados dos ensaios *in vitro* ou *ex vivo*. Sempre que possível, devem ser evitados estudos *in vivo* de substâncias corrosivas. Os factores considerados na estratégia de ensaio incluem:

▼B

Avaliação dos dados existentes sobre humanos e animais (etapa 1). Devem considerar-se em primeiro lugar os dados existentes sobre humanos — por exemplo, estudos clínicos e ocupacionais, relatórios de casos clínicos e/ou dados de ensaios em animais como, por exemplo, dados obtidos em estudos de toxicidade de exposição dérmica simples ou repetida — já que estes dados fornecem informação directamente relacionada com os efeitos na pele. As substâncias que apresentem capacidade irritante ou corrosiva conhecidas, assim como aquelas para as quais existem dados claros de não serem corrosivas nem irritantes, não necessitam de ser ensaiadas em estudos *in vivo.*

Análise de relações estrutura-actividade (SAR) (etapa 2). Devem ser considerados os resultados de ensaios de substâncias químicas estruturalmente semelhantes desde que se encontrem disponíveis. No caso de existirem dados suficientes sobre humanos e/ou animais relativos aos efeitos de substâncias estruturalmente semelhantes, ou misturas deste tipo de substâncias, indicativos do seu potencial de irritação/corrosão dérmica, pode presumir-se que a substância de ensaio em avaliação produzirá as mesmas respostas. Nestes casos, poderá não ser necessário proceder a ensaios da substância de ensaio. Os dados negativos obtidos de estudos de substâncias estruturalmente semelhantes ou misturas dessas substâncias não constituem prova suficiente de não corrosibilidade/não irritabilidade da substância segundo a estratégia de ensaio sequencial. Devem ser utilizadas abordagens de SAR validadas e aceites para identificação do potencial de irritação e de corrosão dérmica.

Propriedades físico-químicas e reactividade química (etapa 3). As substâncias que apresentam um pH extremo, tal como $\leq$ 2,0 ou $\geq$ 11,5, podem ter efeitos locais fortes. Se o pH extremo servir como base de identificação da substância como corrosiva para a pele, a sua reserva ácida/alcalina (ou poder tampão) deve ser também tida em consideração (3) (4). Se o poder tampão indicar que a substância pode não ser corrosiva para a pele, devem ser efectuados ensaios adicionais para confirmar esta indicação, de preferência utilizando ensaios *in vitro* ou *ex vivo* validados e aceites (ver etapas 5 e 6).

Toxicidade dérmica (etapa 4). Caso se tenha provado que uma substância química é muito tóxica por via dérmica, pode não ser exequível um estudo *in vivo* de irritação/corrosão dérmica por a quantidade de substância de ensaio normalmente aplicada poder exceder a dose muito tóxica, resultando consequentemente na morte ou em sofrimento grave dos animais. Além disso, pode não ser necessário efectuar ensaios dérmicos de irritação/corrosão adicionais quando os estudos de toxicidade dérmica utilizando coelhos albinos tenham sido efectuados até um nível de dosagem limite de 2 000 mg/kg de peso corporal ou superior e não tenha sido observada qualquer irritação ou corrosão dérmica. Deve ter-se em conta uma série de considerações aquando da avaliação da toxicidade dérmica aguda em estudos efectuados anteriormente. Por exemplo, a informação contida no relatório sobre lesões dérmicas pode estar incompleta. Os ensaios e as observações podem ter sido efectuados noutra espécie que não o coelho, podendo as várias espécies diferir grandemente na sensibilidade das respostas apresentadas. A forma como a substância de ensaio foi aplicada aos animais pode não ter sido adequada à avaliação da irritação/corrosão da pele [por exemplo, diluição das substâncias para ensaio da toxicidade dérmica (5)]. No entanto, nos casos em que os estudos de toxicidade dérmica em coelhos foram projectados e efectuados correctamente, os resultados negativos podem ser considerados prova suficiente de que a substância não é irritante nem corrosiva.

Resultados de ensaios in vitro *ou* ex vivo *(etapas 5 e 6).* Não é necessário proceder a ensaios em animais com substâncias que tenham apresentado propriedades corrosivas ou de irritação grave num ensaio *in vitro* ou *ex vivo* validado e aceite (6) (7) que tenha sido desenvolvido para avaliar especificamente estes efeitos. Pode considerar-se que tais substâncias produzirão efeitos graves semelhantes *in vivo.*

▼B

Ensaio in vivo *em coelhos (etapas 7 e 8)*. Caso seja tomada a decisão de efectuar um ensaio *in vivo* com base numa análise da importância das provas, este deve começar por um ensaio inicial usando um animal. Se os resultados deste ensaio indicarem que a substância é corrosiva para a pele, não devem ser efectuados outros ensaios. Se o ensaio inicial não revelar quaisquer efeitos corrosivos, a resposta irritante ou negativa deve ser confirmada utilizando até dois animais adicionais com um período de exposição de quatro horas. No caso de se observar um efeito irritante no ensaio inicial, o ensaio de confirmação deve ser efectuado de uma forma sequencial ou através da exposição de dois animais adicionais simultaneamente.

REFERÊNCIAS

(1) OECD, (1996) Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD, (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M., (1998) An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, p. 709-720.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H., (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxicology *In Vitro*, 2(1), p. 19-26.

(5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I., (1996) Animal, Human, and *In Vitro* Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): Dermatotoxicology. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, p. 411-436.

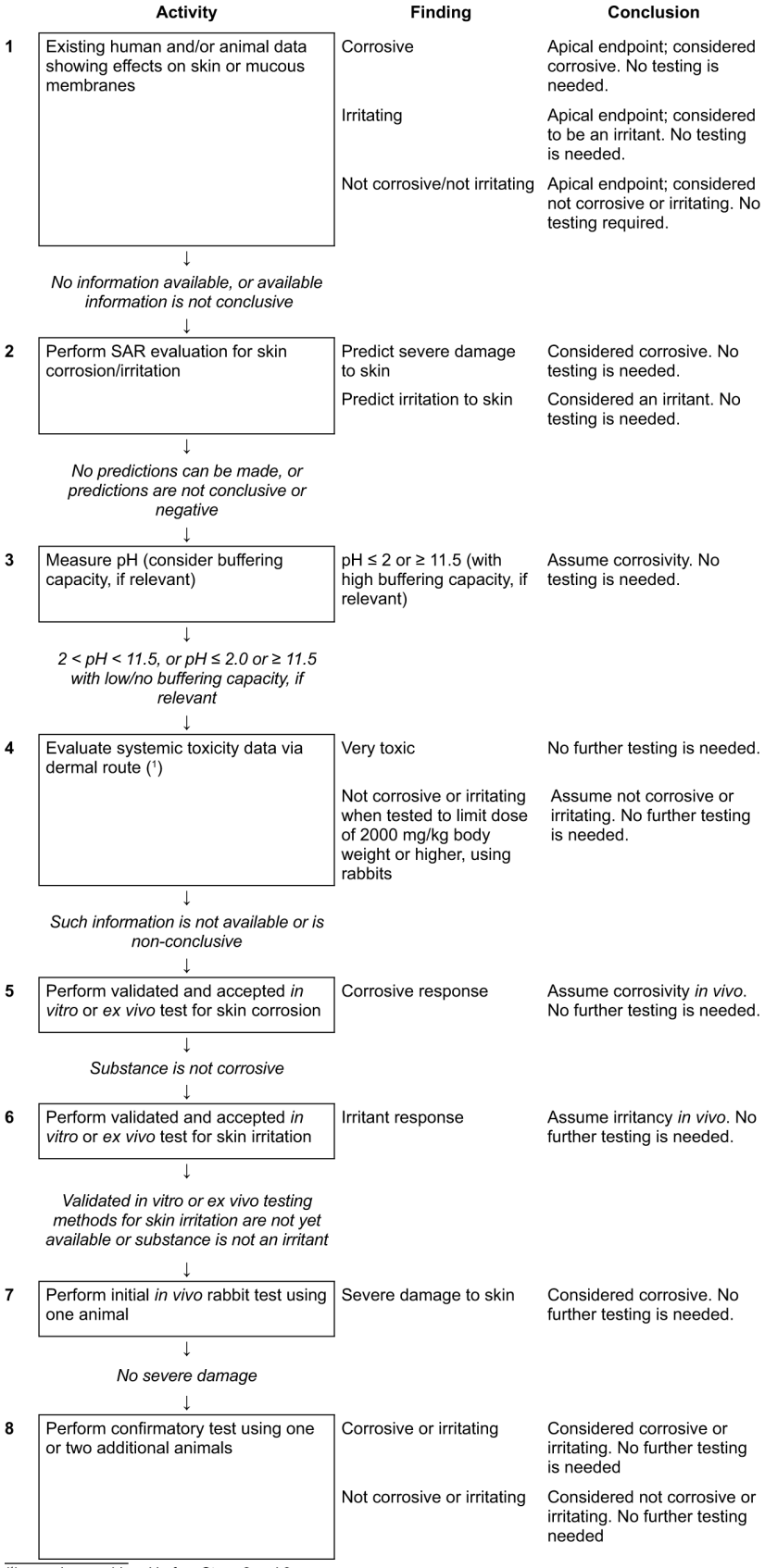
(6) Método de Ensaio B.40.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M., (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, p. 483–524.

▼B

Figura

ESTRATÉGIA DE ENSAIO E AVALIAÇÃO PARA IRRITAÇÃO/CORROSÃO DÉRMICA



(1) can be considered before Steps 2 and 3.

▼B

B.5. **TOXICIDADE AGUDA: IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR**

1. **MÉTODO**

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 405 (2002) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

Na preparação do presente método optimizado foi dada especial importância aos possíveis melhoramentos resultantes da avaliação de toda a informação já existente sobre a substância de ensaio, de modo a evitar ensaios desnecessários em animais de laboratório e assim ter em consideração a problemática da protecção dos animais. O presente método inclui a recomendação de se efectuar uma análise da importância das provas (1) dos dados relevantes existentes antes de se efectuar o ensaio *in vivo* descrito para irritação/corrosão ocular aguda. No caso de não se encontrarem disponíveis dados suficientes, recomenda-se a obtenção desses dados através da aplicação de ensaios sequenciais (2) (3). A estratégia de ensaio recomendada inclui a execução de ensaios *in vitro* validados e aceites e é fornecida como anexo ao método de ensaio. Além disso, recomenda-se o uso de um ensaio *in vivo* de irritação/corrosão dérmica para previsão da corrosão ocular antes de se considerar um ensaio ocular *in vivo.*

Tendo em consideração o interesse científico e a protecção dos animais, não devem ser considerados ensaios *in vivo* até se proceder a uma avaliação de todos os dados disponíveis relevantes à potencial corrosibilidade/capacidade irritante ocular de uma substância para uma análise da importância das provas. Os dados devem incluir provas de estudos existentes em humanos e/ou animais de laboratório, provas de corrosibilidade/capacidade irritante de uma ou mais substâncias estruturalmente relacionadas, ou de misturas dessas substâncias, dados que demonstrem elevada acidez ou alcalinidade da substância (4) (5) e resultados de ensaios *in vitro* ou *ex vivo,* validados e aceites, para corrosão e irritação da pele (6) (6a). Estes estudos podem ter sido efectuados previamente ou como resultado de uma análise de importância das provas.

Uma análise deste tipo pode indicar, para algumas substâncias, a necessidade de estudos *in vivo* do potencial de irritação/corrosão ocular da substância. Em todos estes casos, antes de considerar a utilização de um ensaio ocular *in vivo,* deve efectuar-se preferencialmente um estudo *in vivo* prévio sobre os efeitos dérmicos da substância, avaliados de acordo com o método de ensaio B.4 (7). A aplicação de uma análise de importância das provas e a estratégia de ensaio sequencial deverão reduzir a necessidade de ensaios *in vivo* para a corrosibilidade/capacidade irritante ocular de substâncias para as quais existem suficientes provas prévias de outros estudos. Caso a determinação do potencial de corrosão ou irritação ocular não possa ser efectuada utilizando a estratégia de ensaio sequencial, mesmo após a realização de um estudo *in vivo* da corrosão e irritação dérmica, pode ser efectuado um ensaio *in vivo* de irritação/corrosão ocular.

▼B

Junta-se ao anexo do presente método de ensaio uma estratégia de ensaio sequencial preferível, que inclui a execução de ensaios validados *in vitro* ou *ex vivo* para irritação/corrosão. A estratégia foi desenvolvida num grupo de trabalho (*workshop*) da OCDE (8), no qual foi recomendada por unanimidade dos participantes, tendo sido adoptada como estratégia de ensaio recomendada pelo sistema harmonizado a nível mundial para a classificação de substâncias químicas (GHS) (9). Recomenda-se que a estratégia de ensaio sequencial seja adoptada antes de realizar ensaios *in vivo*. No caso de substâncias novas, recomenda-se uma metodologia de ensaio por etapas para a obtenção de dados científicos sobre a corrosibilidade/-capacidade irritante da substância. No caso de substâncias já existentes mas cujos dados sobre irritação/corrosão dérmica e ocular são insuficientes, recomenda-se a adopção desta estratégia para a obtenção dos dados em falta. Caso se opte por uma estratégia ou protocolo de ensaio diferente ou se decida não aplicar uma metodologia de ensaio por etapas, deverá apresentar-se uma justificação fundamentada.

1.2. DEFINIÇÕES

Irritação ocular: consiste na produção de alterações oculares após a aplicação de uma substância de ensaio à superfície anterior do olho, alterações essas que são completamente reversíveis no intervalo de 21 dias após a aplicação.

Corrosão ocular: consiste na produção de lesões do tecido ocular ou enfraquecimento físico grave da visão após aplicação da substância de ensaio à superfície anterior do olho, não reversíveis no intervalo de 21 dias após a aplicação.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância de ensaio é aplicada em dose única a um dos olhos do animal de experiência; o olho que não sofre tratamento é utilizado como controlo. O grau de irritação/corrosão ocular é avaliado pelas lesões de perfuração da conjuntiva, da córnea e da íris, a intervalos determinados. São também descritos outros efeitos sobre o olho e efeitos sistémicos adversos, de modo a permitir uma avaliação completa dos efeitos. A duração do estudo deve ser suficiente para avaliar a reversibilidade ou irreversibilidade dos efeitos.

Os animais que apresentem sinais continuados de se encontrarem em grave perigo e/ou apresentarem sinais de dor durante qualquer das etapas do ensaio devem ser abatidos e a substância deve ser classificada de acordo com estas observações. Os critérios para a decisão de abater animais moribundos e animais em grave sofrimento podem ser consultados na referência (10).

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Preparação para o ensaio *in vivo***

1.4.1.1. *Selecção de espécies*

O coelho albino é o animal de laboratório mais adequado, devendo ser usados animais adultos, jovens e saudáveis. A utilização de outras estirpes ou espécies deve ser justificada.

1.4.1.2. *Preparação dos animais*

Devem examinar-se ambos os olhos do animal seleccionado provisoriamente para o ensaio 24 horas antes do início do ensaio. Não devem ser usados animais que apresentem irritação ocular, defeitos oculares ou lesão preexistente da córnea.

▼B

1.4.1.3. *Condições de alojamento e alimentação*

Os animais devem ser alojados individualmente. A temperatura do biotério para os coelhos deve ser de 20 ºC (± 3 ºC). A humidade relativa deve ser no mínimo de 30 % e, preferivelmente, não exceder 70 %, excepto durante a lavagem do biotério, devendo no entanto manter-se idealmente a valores de 50 %-60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Como alimentação, podem ser utilizadas dietas de laboratório convencionais com fornecimento ilimitado de água para beber.

1.4.2. **Protocolo de ensaio**

1.4.2.1. *Aplicação da substância de ensaio*

A substância de ensaio deve ser colocada no saco conjuntival de um dos olhos de cada animal, depois de se ter separado cuidadosamente a pálpebra inferior do globo ocular. Fecham-se as pálpebras cuidadosamente durante cerca de um segundo de modo a evitar a perda de material. O outro olho, que permanece sem tratamento, é utilizado como controlo.

1.4.2.2. *Irrigação*

Os olhos dos animais de ensaio não devem ser lavados pelo menos nas 24 horas seguintes à instilação da substância de ensaio, excepto para o caso de sólidos (consultar a secção 1.4.2.3.2) e no caso de ocorrência imediata de efeitos corrosivos ou irritantes. Após 24 horas, desde que se considere apropriada, pode ser efectuada uma lavagem.

Não se recomenda a utilização de um grupo-satélite de animais para investigar a influência da lavagem, excepto se tal se justificar cientificamente. Se for necessário um grupo-satélite de animais, devem utilizar-se dois coelhos. As condições de lavagem devem ser cuidadosamente documentadas, por exemplo, data e hora da lavagem; composição e temperatura da solução de lavagem; duração, volume e velocidade de aplicação.

1.4.2.3. *Nível de dosagem*

1.4.2.3.1. *Ensaio de líquidos*

No caso do ensaio de líquidos, usa-se uma dose de 0,1 ml. Não devem ser utilizados nebulizadores de bomba para instilação directa da substância no olho. O nebulizado líquido deve ser expelido e recolhido num recipiente antes de se instilar 0,1 ml no olho.

1.4.2.3.2. *Ensaio de sólidos*

No caso de ensaio de substâncias sólidas, pastas ou substâncias em partículas, a quantidade usada deve ter um volume de 0,1 ml ou uma massa não superior a 100 mg. O material de ensaio deve ser pulverizado a um pó fino. O volume de material sólido deve ser medido após compactação suave, por exemplo, através de batidas do recipiente que o contém. Se ao tempo da primeira observação, 1 hora após o tratamento, a substância de ensaio sólida não tiver sido removida do olho do animal de ensaio através de mecanismos fisiológicos, o olho pode ser lavado com soro fisiológico ou água destilada.

▼B

1.4.2.3.3. *Ensaio de aerossóis*

Recomenda-se a recolha do conteúdo de todos os nebulizadores de bomba e aerossóis antes de instilação no olho. A única excepção é para substâncias em recipientes de aerossol pressurizados, que não podem ser recolhidos devido à sua vaporização. Nestes casos, deve manter-se o olho aberto e administrar-se a substância de ensaio no olho numa aplicação única de duração aproximada de um segundo, mantendo o recipiente directamente à frente do olho a uma distância de 10 cm. Esta distância pode variar em função da pressão do nebulizador e do seu conteúdo. Devem ser tomadas precauções adequadas para não danificar o olho devido à pressão do nebulizador. Em casos apropriados, pode ser necessário avaliar o potencial de lesão «mecânica» do olho pela força da nebulização.

Pode obter-se uma estimativa da dose de um aerossol através de simulação do ensaio da seguinte forma: nebuliza-se a substância para um papel de pesagem através de uma abertura do tamanho do olho de coelho, colocada directamente em frente do papel. Utiliza-se o aumento de peso do papel como uma aproximação da quantidade nebulizada para o olho. Para substâncias voláteis, a dose pode ser estimada por pesagem do recipiente de recolha antes e após a remoção do material de ensaio.

1.4.2.4. *Ensaio inicial (ensaio in vivo de irritação/corrosão ocular utilizando um animal)*

Tal como articulado na estratégia de ensaio sequencial (ver anexo 1), recomenda-se vivamente que o ensaio *in vivo* seja efectuado inicialmente utilizando um animal.

Se, utilizando o protocolo descrito, os resultados deste ensaio indicarem que a substância é corrosiva ou fortemente irritante para o olho, não devem ser efectuados outros ensaios de irritação ocular.

1.4.2.5. *Anestesia local*

A utilização de anestesia local pode ser feita, mas analisando a sua necessidade caso a caso. Se a análise de importância das provas indicar que a substância pode causar dor ou se os ensaios iniciais revelarem ocorrência de reacção dolorosa, pode utilizar-se um anestésico local antes da instilação da substância de ensaio. A selecção do tipo, concentração e dose de anestésico local deve ser feita cuidadosamente de modo a assegurar que a sua utilização não altere a reacção à substância de ensaio. O olho de controlo deve ser anestesiado de igual forma.

1.4.2.6. *Ensaio de confirmação (ensaio in vivo de irritação ocular com animais adicionais)*

Se não for observado um efeito corrosivo no ensaio inicial, a resposta irritante ou negativa deve ser confirmada utilizando até dois animais adicionais. Se for observado no ensaio inicial um efeito francamente irritante, indicativo de um efeito possivelmente forte (irreversível) no ensaio de confirmação, recomenda-se que se efectue o ensaio de confirmação de uma forma sequencial num animal de cada vez, em vez de expor dois animais adicionais simultaneamente. Se o segundo animal apresentar efeitos corrosivos ou fortemente irritantes, não se deve continuar o ensaio. Pode ser necessária a utilização de animais adicionais para confirmar respostas de irritação fracas ou moderadas.

▼B

1.4.2.7. *Período de observação*

A duração do período de observação deve ser suficiente para uma avaliação completa da magnitude e reversibilidade dos efeitos observados. No entanto, a experiência deve ser interrompida em qualquer altura se o animal apresentar sintomas continuados de dor intensa ou de se encontrar em situação de perigo (9). Para a determinação da reversibilidade dos efeitos, os animais devem ser examinados normalmente durante 21 dias após a administração da substância de ensaio. No caso de se observar reversibilidade antes do fim do período de 21 dias, deve interromper-se a experiência.

1.4.2.7.1. *Observações clínicas e graduação das reacções oculares*

Os olhos devem ser examinados 1, 24, 48 e 72 horas após a aplicação da substância de ensaio. Os animais só devem ser mantidos sob ensaio durante o tempo necessário para obter informação definitiva. Os animais que apresentem sintomas continuados de dor intensa ou de perigo devem ser abatidos sem demora, sendo a substância classificada de acordo com estes resultados. Os animais que apresentem as seguintes lesões oculares posteriores à instilação devem ser abatidos: perfuração da córnea; ulceração significativa da córnea, incluindo estafiloma; sangue na câmara anterior do olho; opacidade da córnea de grau 4 persistente durante 48 horas; ausência de reflexo à luz (resposta da íris de grau 2) persistente durante 72 horas; ulceração da membrana conjuntival; necrose da conjuntiva ou da membrana nictitante; ou formação de crosta. Este procedimento é devido ao facto de normalmente este tipo de lesões ser irreversível.

Os ensaios com animais que não desenvolvam lesões oculares podem ser interrompidos, mas não antes de três dias após a instilação. Os animais que apresentem lesões fracas a moderadas devem permanecer sob observação até cura de todas as lesões ou durante o período de 21 dias, após o qual o estudo é finalizado. As observações devem ser efectuadas 7, 14 e 21 dias após a aplicação de modo a determinar o estado das lesões e a sua reversibilidade ou irreversibilidade.

Os graus da reacção ocular (conjuntiva, córnea e íris) devem ser anotados em cada exame (tabela I). Quaisquer outras lesões do olho (por exemplo, *pannus* da córnea, coloração) ou efeitos sistémicos adversos devem igualmente ser incluídos no relatório.

O exame das reacções pode ser facilitado pela utilização de uma lupa binocular, de uma lâmpada de fenda manual, de um biomicroscópio ou de outro instrumento apropriado. Após anotação das observações no final de 24 horas, o exame aos olhos pode ser feito recorrendo a fluoresceína.

A graduação das respostas oculares é necessariamente subjectiva. O pessoal que executa as observações deve ser treinado adequadamente no sistema de graduação utilizado para promover a harmonização da graduação da resposta ocular e auxiliar os laboratórios de ensaio e as pessoas envolvidas na obtenção e interpretação das observações.

2. **DADOS**

2.2. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados de irritação ocular devem ser avaliados conjuntamente com a natureza e gravidade das lesões e a sua reversibilidade ou ausência de reversibilidade. As respostas individuais não representam um padrão absoluto das propriedades irritantes do material, já que são também avaliados outros efeitos do material de ensaio. Pelo contrário, os resultados individuais devem ser encarados como valores de referência que só são significativos quando corroborados por uma descrição e avaliação completas de todas as observações.

▼B

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Fundamentação lógica para o ensaio *in vivo:* análise de importância das provas dos dados de ensaio preexistentes, incluindo os resultados da estratégia de ensaio sequencial:

— descrição dos dados relevantes disponíveis de ensaios anteriores;

— dados obtidos em cada etapa da estratégia de ensaio;

— descrição dos ensaios *in vitro* efectuados, incluindo detalhes sobre o protocolo, resultados obtidos com substâncias de ensaio/-referência;

— descrição do estudo efectuado *in vivo* sobre irritação/corrosão dérmica, incluindo os resultados obtidos;

— análise de importância das provas para a realização do estudo *in vivo*.

Substância de ensaio:

— dados de identificação (por exemplo, número CAS, origem, grau de pureza, impurezas conhecidas, número de lote);

— natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, pH, volatilidade, solubilidade, estabilidade, reactividade com água);

— no caso de misturas, composição e percentagens relativas dos componentes;

— no caso de utilização de um anestésico local, identificação, grau de pureza, tipo, dose e interacção potencial com a substância de ensaio.

Excipiente:

— identificação, concentração (quando apropriado), volume utilizado;

— justificação para a escolha do excipiente.

Animais de ensaio:

— espécie/estirpe utilizada, fundamentação lógica para a utilização de outro tipo de animais que não coelhos albinos;

— idade de cada animal no início do estudo;

— número de animais de cada sexo no ensaio e nos grupos de controlo (se necessário);

— peso individual dos animais no início e no final do ensaio;

— origem, condições de alojamento, dieta, etc.

Resultados:

— descrição do método utilizado para medir a irritação em cada observação (por exemplo, lâmpada de fenda manual, biomicroscópio, fluoresceína);

▼B

— disposição em tabelas dos dados sobre a resposta irritante/-corrosiva para cada animal em cada observação até remoção do animal do ensaio;

— descrição pormenorizada do grau e natureza da irritação ou corrosão observadas;

— descrição de quaisquer outras lesões do olho observadas (por exemplo, vascularização, formação de *pannus* da córnea, adesões, coloração);

— descrição de efeitos não oculares locais e efeitos sistémicos adversos e, caso sejam efectuadas, das observações histopatológicas.

Análise dos resultados.

3.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A extrapolação dos resultados dos estudos de irritação ocular em animais de laboratório para humanos tem uma validade limitada. Em muitos casos, o coelho albino é mais sensível do que os humanos a substâncias irritantes ou corrosivas oculares.

A interpretação dos dados deve ser feita cuidadosamente de modo a excluir irritação resultante de infecções secundárias.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P., (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, p. 410-429.

(2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N., (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, p. 159-164.

(3) Worth A.P. and Fentem J.H., (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H., (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicology *In Vitro*, 2, p. 19-26.

(5) Neun, D.J., (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, p. 227-231.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M., (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, p. 483-524.

(6a) Método de Ensaio B.40 para corrosão da pele.

(7) Método de Ensaio B.4. Toxicidade aguda: irritação/corrosão dérmica.

(8) OECD, (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

▼B

(9) OECD, (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(10) OECD, (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No 19 (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

▼B

Tabela I

GRADUAÇÃO DE LESÕES OCULARES

Córnea

Opacidade: grau de densidade (as medições devem ser efectuadas na área mais densa) (*)

Sem ulceração nem opacidade	0
Áreas de opacidade escassas ou difusas (para além de uma pequena perda do lustre normal); detalhes da íris claramente visíveis	1
Área translúcida claramente discernível; detalhes da íris ligeiramente obscurecidos	2
Área nacarada; não são visíveis os detalhes da íris; o tamanho da pupila é dificilmente discernível	3
Córnea opaca; a íris não é discernível através da opacidade	4

Máximo possível: 4

NOTAS

(*) Deve ser anotada qual a área de opacidade da córnea.

Íris

Normal	0
Rugas marcadamente profundas, congestão, tumefacção, hiperemia ao redor da córnea moderada; ou injecção; íris reactiva à luz (considera-se que uma reacção lenta é um efeito)	1
Hemorragia, destruição maciça ou ausência de reacção à luz	2

Máximo possível: 2

Conjuntiva

Vermelhidão (refere-se à conjuntiva palpebral e bulbar; excluindo a córnea e a íris)

Normal	0
Alguns vasos sanguíneos com hiperemia (injectados)	1
Cor carmesim difusa; vasos individuais não são claramente discerníveis	2
Cor vermelho-carne difusa	3

Máximo possível: 3

Quimiose

Tumefacção (refere-se às pálpebras e/ou às membranas nictantes)

Normal	0
Alguma tumefacção acima do normal	1
Tumefacção óbvia, com eversão parcial das pálpebras	2
Tumefacção, com as pálpebras semicerradas	3
Tumefacção, com as pálpebras mais do que semicerradas	4

Máximo possível: 4

▼B

ANEXO

Uma estratégia de ensaio sequencial para a irritação e corrosão ocular

CONSIDERAÇÕES GERAIS

No sentido de atender aos interesses quer científicos, quer da protecção dos animais, torna-se importante evitar o uso desnecessário de animais e minimizar os ensaios que possam causar reacções graves em animais. Deve ser analisada toda a informação sobre a substância que seja relevante para a sua potencial capacidade irritante/corrosibilidade ocular antes de se considerarem os ensaios *in vivo*. É possível que existam já dados suficientes para classificar a substância de ensaio segundo o seu potencial irritante ou corrosivo ocular, sem necessidade de recorrer a ensaios em animais de laboratório. Assim, a utilização de uma análise de importância das provas e de uma estratégia de ensaio sequencial minimizará a necessidade de ensaios *in vivo,* especialmente no caso de substâncias susceptíveis de produzir reacções graves.

Recomenda-se a utilização da análise de importância das provas para avaliar a informação existente sobre irritação e corrosão ocular e determinar a necessidade de se efectuar estudos adicionais, diferentes dos estudos oculares *in vivo,* que sejam úteis para caracterizar o referido potencial. No caso de serem necessários estudos adicionais, recomenda-se a utilização de uma estratégia de ensaio sequencial para a obtenção dos dados experimentais relevantes. No caso de substâncias para as quais não exista nenhuma história de ensaios, deve ser utilizada a estratégia sequencial para a obtenção dos dados necessários para avaliar a sua irritação/corrosão ocular. A estratégia de ensaio descrita no presente anexo foi desenvolvida num grupo de trabalho (*workshop*) da OCDE (1). Foi subsequentemente confirmado e ampliado no sistema harmonizado e integrado de classificação de perigos para a saúde humana e efeitos ambientais de substâncias químicas, tal como foi aprovado pela 28.ª sessão conjunta do comité das substâncias químicas e do grupo de trabalho de substâncias químicas, em Novembro de 1998 (2).

Apesar da presente estratégia de ensaio não fazer parte integrante do método de ensaio B.5, ela expressa a metodologia recomendada para a determinação das propriedades de irritação/corrosão ocular. Esta metodologia representa não só a melhor prática como também um ponto de referência ético para o ensaio *in vivo* para irritação/corrosão ocular. O método de ensaio fornece uma orientação para a realização do ensaio *in vivo* e resume os factores que devem ser considerados antes de ponderar a execução deste ensaio. A estratégia de ensaio sequencial fornece uma metodologia de análise da importância das provas para a avaliação dos dados existentes sobre as propriedades de irritação/corrosão ocular de substâncias e uma metodologia em séries para a obtenção de dados relevantes sobre substâncias para as quais sejam necessários estudos adicionais ou para os quais não tenham sido efectuados quaisquer estudos. A estratégia inclui inicialmente a realização de ensaios *in vitro* ou *ex vivo* validados e aceites e, seguidamente, do método de ensaio B.4 para o estudo de irritação/corrosão dérmica em circunstâncias específicas (3) (4).

DESCRIÇÃO DA ESTRATÉGIA DE ENSAIO POR ETAPAS

Antes da realização dos ensaios como parte da estratégia de ensaio sequencial (figura) deve ser avaliada toda a informação disponível de modo a determinar a necessidade de realização de ensaios oculares *in vivo.* Apesar de ser possível obter informação significativa a partir da avaliação de um só parâmetro (por exemplo, pH extremo), deve ser avaliada a totalidade da informação existente. Para uma decisão baseada na análise da importância das provas, devem ser avaliados todos os dados relevantes sobre os efeitos da substância em causa, bem como dos seus análogos estruturais, e deve apresentar-se uma justificação fundamentada para a decisão tomada. Deve dar-se especial relevância aos dados existentes sobre a substância relativamente a humanos e animais e, seguidamente, aos resultados dos ensaios *in vitro* ou *ex vivo.* Sempre que possível, devem ser evitados estudos *in vivo* de substâncias corrosivas. Os factores considerados na estratégia de ensaio incluem:

▼B

Avaliação dos dados existentes sobre humanos e animais (etapa 1). Devem considerar-se em primeiro lugar os dados existentes sobre humanos — por exemplo, estudos clínicos e ocupacionais, relatórios de casos clínicos e/ou dados de ensaios de estudos oculares em animais —, já que estes dados fornecem informação directamente relacionada com os efeitos nos olhos. Em seguida, devem ser avaliados os dados disponíveis sobre estudos de investigação da irritação/corrosão dérmica em humanos e/ou animais. As substâncias que apresentem evidências de corrosibilidade ou capacidade irritante grave para os olhos conhecidas não devem ser instiladas em olhos de animais. De igual forma, as substâncias que apresentam efeitos corrosivos ou irritantes para a pele também não devem ser instiladas em olhos de animais, devendo ser consideradas igualmente corrosivas e/ou irritantes para os olhos. As substâncias que apresentem provas suficientes de não serem corrosivas ou irritantes em estudos oculares efectuados anteriormente também não devem ser ensaiadas em estudos oculares *in vivo.*

Análise de relações estrutura-actividade (SAR) (etapa 2). Devem ser considerados os resultados de ensaios de substâncias químicas estruturalmente semelhantes, caso se encontrem disponíveis. No caso de existirem dados sobre humanos e/ou animais suficientes, relativos aos efeitos de substâncias estruturalmente semelhantes ou a misturas deste tipo de substâncias, indicativos do seu potencial de irritação/corrosão ocular, pode presumir-se que a substância de ensaio produzirá as mesmas reacções. Nestes casos, poderá não ser necessário proceder a ensaios da substância. Os dados negativos obtidos de estudos de substâncias estruturalmente semelhantes ou misturas dessas substâncias não constituem prova suficiente de não-corrosibilidade/não-irritabilidade da substância sob estratégia de ensaio sequencial. Devem ser utilizadas abordagens de SAR validadas e aceites para identificação do potencial de irritação e corrosão, tanto dos efeitos dérmicos como oculares.

Propriedades físico-químicas e reactividade química (etapa 3). As substâncias que apresentam pH extremos, tais como ≤ 2,0 ou ≥ 11,5, podem ter efeitos locais fortes. Se o pH extremo servir como base de identificação da corrosibilidade ou capacidade irritante ocular de uma substância, a sua reserva ácida/alcalina (poder tampão) também deve ser tida em consideração (5) (6). Se o poder tampão indicar que a substância pode não ser corrosiva para o olho, devem ser efectuados ensaios adicionais para confirmar esta indicação, de preferência utilizando ensaios *in vitro* ou *ex vivo* validados e aceites (ver secção das etapas 5 e 6).

Consideração de outras informações existentes (etapa 4). Nesta etapa, deve ser avaliada toda a informação disponível sobre toxicidade sistémica por via dérmica. Deve ser também considerada a toxicidade dérmica aguda da substância de ensaio. Se tiver sido demonstrado que a substância é muito tóxica por via dérmica pode não ser necessário efectuar ensaios oculares. Apesar de não existir necessariamente uma relação entre a toxicidade dérmica aguda e a irritação/-corrosão ocular, pode considerar-se que se um agente é muito tóxico por via dérmica, também mostrará elevada toxicidade quando instilado no olho. Estes dados podem ser também considerados entre as etapas 2 e 3.

Resultados de ensaios in vitro *ou* ex vivo *(etapas 5 e 6).* Não é necessário proceder a ensaios em animais de substâncias que tenham apresentado propriedades corrosivas ou de irritação grave em ensaios *in vitro* ou *ex vivo* (7) (8) que tenham sido validados e aceites para estimar especificamente a corrosibilidade/-capacidade de irritação ocular ou dérmica. Pode considerar-se que estas substâncias produzirão efeitos graves semelhantes *in vivo.* Se não se encontrarem disponíveis ensaios *in vitro/ex vivo* validados e aceites, devem ultrapassar-se as etapas 5 e 6 e passar-se directamente à etapa 7.

Avaliação da capacidade irritante ou corrosibilidade dérmica in vivo *de uma substância (etapa 7).* Caso não existam dados suficientes para uma análise da importância das provas conclusiva sobre o potencial de irritação/corrosão de uma substância baseada nos dados dos estudos supramencionados, deve proceder-se em primeiro lugar a uma avaliação do potencial de irritação/corrosão dérmica *in vivo,* utilizando o método de ensaio B.4 (4) e o seu anexo (9). Se a substância causar corrosão ou irritação grave da pele, deve ser considerada um irritante ocular corrosivo, excepto se existir outro tipo de informação que apoie uma conclusão alternativa. Assim, não há necessidade de efectuar um ensaio ocular *in vivo.* Se a substância não for corrosiva ou gravemente irritante para a pele, deve efectuar-se um ensaio ocular *in vivo.*

▼B

Ensaio in vivo *em coelhos* (etapas 8 e 9). O ensaio ocular *in vivo* deve começar por um ensaio inicial usando um animal. Se os resultados deste ensaio indicarem que a substância provoca irritação grave ou é corrosiva para os olhos, não devem ser efectuados outros ensaios. Se o ensaio não revelar quaisquer efeitos corrosivos ou de irritação grave, deve efectuar-se um ensaio de confirmação com dois animais adicionais.

REFERÊNCIAS

(1) OECD, (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD, (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P. and Fentem J.H., (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, p. 161-177.

(4) Método de ensaio B.4. Toxicidade aguda: irritação/corrosão dérmica.

(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H., (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicology *In Vitro*, 2, p. 19-26.

(6) Neun, D.J., (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, p. 227-231.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M., (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, p. 483–524.

(8) Método de Ensaio B.40. Corrosão dérmica.

(9) Anexo ao método de ensaio B.4: Uma estratégia de ensaio sequencial para irritação e corrosão dérmicas.

▼B

Figura

Estratégia de ensaio e avaliação para irritação/corrosão ocular

	Actividade	Observação	Conclusão
1	Dados existentes para humanos e/ou animais mostram efeitos oculares	Lesões oculares graves	Ponto final apical; considerar corrosivo para os olhos. Não é necessário ensaio.
		Irritante ocular	Ponto final apical; considerar irritante para os olhos. Não é necessário ensaio.
		Não corrosivo/não irritante para os olhos	Ponto final apical; considerar não corrosivo e não irritante para os olhos. Não é necessário ensaio.
	Dados existentes para humanos e/ou animais mostram efeitos corrosivos na pele	Corrosivo dérmico	Assumir corrosibilidade para os olhos. Não é necessário ensaio.
	Dados existentes para humanos e/ou animais mostram efeitos de irritação grave na pele	Irritante dérmico grave	Assumir capacidade irritante para os olhos. Não é necessário ensaio.
	↓		
	Não existe informação disponível ou a informação disponível não é conclusiva		
	↓		
2	Efectuar SAR para irritação/corrosão ocular	Previsão de lesões oculares graves	Assumir corrosibilidade para os olhos. Não é necessário ensaio.
		Previsão de irritação ocular	Assumir capacidade irritante para os olhos. Não é necessário ensaio.
	Efectuar SAR para corrosão dérmica	Previsão de corrosibilidade dérmica	Assumir corrosibilidade para os olhos. Não é necessário ensaio.
	↓		
	Não é possível fazer quaisquer previsões ou as previsões são inconclusivas ou negativas		
	↓		
3	Medir pH (poder tampão, caso seja relevante)	pH ≤ 2 ou ≥ 11,5 (com elevado poder tampão, caso seja relevante)	Assumir corrosibilidade para os olhos. Não é necessário ensaio.
	↓		
	2< pH < 11.5, ou pH ≤ 2,0 ou ≥ 11,5 com baixo ou nenhum poder tampão, caso seja relevante		
	↓		
4	Avaliar a toxicidade sistémica por via dérmica	Muito tóxico a concentrações semelhantes àquelas que seriam utilizadas no ensaio ocular.	A substância seria demasiado tóxica para ser utilizada no ensaio. Não é necessário ensaio.
	↓		
	Não existe essa informação disponível ou a substância não é muito tóxica		
	↓		

▼B

5	Executar ensaio *in vitro* ou *ex vivo* validado e aceite para corrosão ocular	Reacção corrosiva	Assumir corrosibilidade para os olhos. Não são necessários ensaios adicionais.
	↓		
	A substância não é corrosiva ou não se encontram ainda disponíveis métodos de ensaio in vitro *ou* ex vivo *validado para corrosão ocular*		
	↓		
6	Executar ensaio *in vitro* ou *ex vivo* validado e aceite para irritação ocular	Reacção de irritação	Assumir capacidade irritante para os olhos. Não são necessários ensaios adicionais.
	↓		
	A substância não é irritante ou não se encontram ainda disponíveis métodos de ensaio in vitro *ou* ex vivo *validado para irritação ocular*		
	↓		
7	Avaliar experimentalmente o potencial de irritação/corrosão dérmica *in vivo* (ver Método de ensaio B.4. incluindo o seu Anexo)	Reacção corrosiva ou de irritação grave	Assumir corrosibilidade para os olhos. Não é necessário ensaio.
	↓		
	A substância não é corrosiva nem provoca irritação grave na pele		
	↓		
8	Executar ensaio ocular inicial *in vivo* em coelhos usando um animal	Lesões oculares graves	Assumir corrosibilidade para os olhos. Não são necessários mais ensaios.
	↓		
	Não ocorrem lesões graves ou não há reacção		
	↓		
9	Executar ensaio de confirmação usando um ou dois animais adicionais	Corrosiva ou irritante	Considerar corrosiva ou irritante para os olhos. Não são necessários mais ensaios.
		Não corrosiva nem irritante	Considerar não irritante e não corrosiva para os olhos. Não são necessários mais ensaios.

▼B

B.6. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

Observações

A sensibilidade e capacidade dos métodos de ensaio para detectar substâncias que possam induzir sensibilização cutânea considera-se importante num sistema de classificação em matéria de toxicidade no domínio da saúde pública.

Não existe um método único que permita identificar de modo adequado todas as substâncias que possuam um potencial de sensibilização cutânea para o homem.

Na selecção do método de ensaio devem ter-se em conta factores tais como as características físicas da substância, nomeadamente a sua capacidade de penetração na pele.

Desenvolveram-se dois tipos de ensaios em porquinhos-da-índia: ensaios com adjuvantes, em que a reacção alérgica é desencadeada por uma solução ou suspensão da substância em estudo em «adjuvante completo de Freunds», e os ensaios sem adjuvantes.

Em geral, os ensaios com adjuvantes permitem determinar o potencial de sensibilização cutânea no homem com mais precisão que os métodos que não utilizam o «adjuvante completo de Freunds», pelo que são preferíveis.

O ensaio de maximização em porquinhos-da-índia constitui um método com adjuvante largamente utilizado. Embora possam utilizar-se vários outros métodos para determinar o potencial de sensibilização cutânea, o método em causa é considerado o mais adequado.

Os ensaios sem adjuvantes (de que o ensaio de Buehler constitui o mais popular) são considerados menos sensíveis quando aplicados a determinadas classes de substâncias.

Em alguns casos, podem existir motivos para a selecção do ensaio de Buehler, em que se procede à aplicação tópica, em vez do método de maximização em porquinhos-da-índia, que utiliza a injecção intradérmica. No caso do recurso ao método de Buehler, deve fornecer-se a respectiva justificação.

O presente método descreve o ensaio de maximização em porquinhos-da-índia e o método de Buehler. Pode recorrer-se a outros métodos devidamente validados cuja utilização seja cientificamente justificada.

Se um ensaio de despiste reconhecido fornecer um resultado positivo, a substância submetida ao ensaio pode ser designada potencialmente sensibilizante e pode não ser necessário efectuar subsequentemente um ensaio com cobaias. No entanto, se o referido ensaio fornecer um resultado negativo, é necessário efectuar um ensaio com cobaias segundo a metodologia aplicável ao presente método de ensaio.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

▼B

1.2. DEFINIÇÕES

Sensibilização cutânea (dermatite de contacto alérgica): reacção cutânea, de origem imunológica, a uma determinada substância. No homem, a reacção pode incluir pruridos, eritrema, edema, pápulas, vesículas, bolhas ou uma combinação dos mesmos. Em outras espécies, as reacções podem diferir, embora apenas se observe eritrema e edema.

Exposição de indução: exposição experimental de um indivíduo a uma substância em estudo, com o objectivo de induzir uma reacção de hipersensibilidade.

Período de indução: período de, pelo menos, uma semana após a exposição de indução, durante o qual pode surgir uma reacção de hipersensibilidade.

Exposição de desencadeamento: exposição experimental a uma determinada substância, após o período de indução, de um indivíduo previamente exposto à mesma, de modo a averiguar uma eventual reacção de hipersensibilidade.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

A sensibilidade e a fiabilidade da técnica experimental utilizada devem ser determinadas semestralmente por recurso a substâncias que se saiba possuírem propriedades de sensibilização cutânea ligeiras ou moderadas.

Num ensaio realizado de forma adequada, a utilização de um sensibilizante ligeiro ou moderado deve determinar uma reacção de pelo menos 30 %, no caso de um ensaio com adjuvante, e de pelo menos 15 % no caso de um ensaio sem adjuvante.

Recomenda-se a utilização das substâncias seguintes:

Número CAS	Número EINECS	Denominação EINECS	Denominação comum
101-86-0	202-983-3	α-Hexilcinamaldeído	α-Hexilcinamaldeído
149-30-4	205-736-8	Benzotiazolo-2-tiol (mercaptobenzotiazolo)	Kaptax
94-09-7	202-303-5	Benzocaína	Norcaína

Em determinados casos devidamente justificados podem utilizar-se outras substâncias que satisfaçam os critérios atrás referidos.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Os animais utilizados são inicialmente expostos à substância em estudo por injecção intradérmica e/ou aplicação epidérmica (exposição de indução). Após um período de repouso de 14 dias (período de indução), durante o qual poderá observar-se uma reacção imunitária, os animais são expostos a uma dose de desencadeamento. A extensão e o grau da reacção cutânea à exposição de desencadeamento nos animais do lote de ensaio é comparada com a reacção observada nos animais do lote de controlo, sujeitos a um produto inactivo na fase da indução e objecto da exposição de desencadeamento.

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Caso se afigure aconselhável a remoção da substância em estudo, deve utilizar-se para tal água ou um solvente adequado que não altere a reacção observada, bem como a integridade da epiderme.

▼B

1.5.1. *Ensaio de maximização nos porquinhos-da-índia*

1.5.1.1. Preparação

Os animais (porquinhos-da-índia albinos adultos, jovens e saudáveis) são aclimatados às condições laboratoriais durante, pelo menos, cinco dias. Antes do ensaio, procede-se à respectiva distribuição aleatória por lotes. O pêlo é removido com o auxílio de uma tesoura ou lâmina ou, eventualmente, por depilação química, de acordo com o método utilizado. Deve evitar-se produzir feridas. Os animais são pesados antes do início do ensaio e após o respectivo termo.

1.5.1.2. Condições de ensaio

1.5.1.2.1. Animais de ensaio

Os animais devem ser porquinhos-da-índia albinos de utilização corrente em laboratório.

1.5.1.2.2. Número e sexo

Podem utilizar-se animais de ambos os sexos. Caso se utilizem fêmeas, estas devem ser nulíparas e não grávidas.

Utiliza-se um mínimo de 10 animais no lote de ensaio e um mínimo de cinco animais no lote de controlo. Caso se utilizem menos de 20 animais no lote de ensaio e menos de 10 animais no lote de controlo, não é possível concluir a natureza sensibilizante do produto, pelo que se recomenda vivamente a realização de ensaios com outros animais, até atingir os números referidos.

1.5.1.2.3. Doses

A concentração de substância em estudo utilizada em cada exposição por indução deve apresentar uma boa tolerância sistémica e corresponder à concentração máxima que produz uma irritação cutânea ligeira a moderada. A concentração utilizada na exposição de desencadeamento deve consistir na dose máxima não irritante. Se necessário, as concentrações adequadas podem ser determinadas a partir de um estudo-piloto utilizando dois ou três animais. Para tal, devem utilizar-se animais objecto de ensaio com «adjuvante completo de Freunds».

1.5.1.3. Procedimento

1.5.1.3.1. Indução

Dia 0 — lote de ensaio

Administram-se três pares de injecções intradérmicas de 0,1 ml na região da espádua.

1.ª injecção: mistura «adjuvante completo de Freunds»/água ou soro fisiológico (1:1) (v/v).

2.ª injecção: substância em estudo dissolvida num veículo adequado, na concentração escolhida.

3.ª injecção: substância em estudo dissolvida numa mistura «adjuvante completo de Freunds»/água ou soro fisiológico (1:1) (v/v), na concentração escolhida.

Na 3.ª injecção, as substâncias hidrossolúveis são dissolvidas na fase aquosa antes da mistura com «adjuvante completo de Freunds». As substâncias lipossolúveis ou insolúveis são suspensas em «adjuvante completo de Freunds» antes de adicionadas à fase aquosa. A concentração final da substância em estudo deve ser igual à utilizada na 2.ª injecção.

▼B

As 1.ª e 2.ª injecções são administradas em regiões vizinhas, tão próximas quanto possível do crânio, enquanto que a 3.ª injecção é administrada na parte posterior da zona de ensaio.

Dia 0 — lote de controlo

Administram-se três pares de injecções intradérmicas de 0,1 ml na mesma região usada no caso dos animais do lote de ensaio.

1.ª injecção: mistura «adjuvante completo de Freunds»/água ou soro fisiológico (1:1) (v/v).

2.ª injecção: veículo não diluído.

3.ª injecção: mistura a 50 % (m/v) do veículo numa mistura «adjuvante completo de Freunds»/água ou soro fisiológico (1:1) (v/v).

5.º-7.º dias — lotes de ensaio e de controlo

No caso de a substância não constituir um irritante cutâneo, a zona de ensaio, com o pêlo previamente removido, é tratada, cerca de 24 horas antes da aplicação tópica de indução, com 0,5 ml de solução a 10 % de laurilssulfato de sódio em vaselina, de modo a produzir irritação local.

6.º-8.º dias — lote de ensaio

O pêlo é novamente removido da zona de ensaio. Impregna-se totalmente uma folha de papel de filtro (2 × 4 cm) da substância em estudo, dissolvida ou suspensa num veículo adequado, que se aplica na zona de ensaio, sendo mantida em contacto com a mesma durante 48 horas, com o auxílio de um penso oclusivo. Deve justificar-se a escolha do veículo utilizado. Os sólidos devem ser finamente divididos e incorporados num veículo adequado. Os líquidos podem ser aplicados directamente, se for caso disso.

6.º-8.º dias — lote de controlo

O pêlo é novamente removido da zona de ensaio. O veículo é aplicado de modo análogo ao anteriormente descrito, sendo também mantido em contacto com a referida zona durante 48 horas, com o auxílio de um penso oclusivo.

1.5.1.3.2. Desencadeamento

20.º-22.º dias — lotes de ensaio e de controlo

Remove-se o pêlo do flanco dos animais dos lotes de ensaio e de controlo. Aplica-se num dos flancos de cada animal um apósito ou uma câmara impregnados da substância em estudo; se necessário, pode aplicar-se no outro flanco um apósito ou uma câmara impregnados do veículo. Os sistemas em causa são mantidos em contacto com a pele com o auxílio de um penso oclusivo.

1.5.1.3.3. Observação e avaliação: lotes de ensaio e de controlo

— Cerca de 21 horas após a remoção do apósito ou da câmara, a zona em estudo é limpa, sendo o pêlo removido com o auxílio de uma tesoura ou lâmina, se necessário.

— Cerca de 3 horas depois (ou seja, cerca de 48 horas após o início do ensaio), observa-se a reacção cutânea, que se regista de acordo com a escala indicada no apêndice.

— Cerca de 24 horas após a primeira observação (72 horas após o início do ensaio), procede-se a um novo exame, cujos resultados se registam de modo análogo.

Recomenda-se a realização de leituras cegas com os animais dos lotes de ensaio e de controlo.

Caso seja necessário clarificar os resultados obtidos no primeiro ensaio de desencadeamento, pode realizar-se um segundo ensaio com um novo lote de controlo, cerca de uma semana depois. Pode também realizar-se um segundo ensaio de desencadeamento com o mesmo lote de controlo.

▼B

Devem observar-se e registar-se de acordo com a escala de Magnusson/Kligman (ver apêndice) todas as reacções anormais, nomeadamente reacções sistémicas, resultantes dos processos de indução e desencadeamento. Além disso, podem efectuar-se outros exames, nomeadamente um exame histopatológico ou uma determinação da espessura da prega cutânea, com o objectivo de clarificar eventuais reacções duvidosas.

1.5.2. *Ensaio de Buehler*

1.5.2.1. Preparação

Os animais (porquinhos-da-índia albinos adultos, jovens e saudáveis) são aclimatados às condições laboratoriais durante, pelo menos, cinco dias. Antes do ensaio, procede-se à respectiva distribuição aleatória por lotes. O pêlo é removido com o auxílio de uma tesoura ou lâmina ou, eventualmente, por depilação química, de acordo com o método utilizado. Deve evitar-se produzir feridas. Os animais são pesados antes do início do ensaio e após o respectivo termo.

1.5.2.2. Condições de ensaio

1.5.2.2.1. Animais de ensaio

Os animais devem ser porquinhos-da-índia albinos de utilização corrente em laboratório.

1.5.2.2.2. Número e sexo

Podem utilizar-se animais de ambos os sexos. Caso se utilizem fêmeas, estas últimas devem ser nulíparas e não grávidas.

Utiliza-se um mínimo de 20 animais no lote de ensaio e um mínimo de 10 animais no lote de controlo.

1.5.2.2.3. Doses

A concentração de substância em estudo utilizada em cada exposição por indução deve corresponder à concentração máxima que produz uma irritação cutânea moderada. A concentração utilizada na exposição de desencadeamento deve consistir na dose máxima não irritante. Se necessário, as concentrações adequadas podem ser determinadas a partir de um estudo-piloto utilizando dois ou três animais.

No caso de as substâncias em estudo serem hidrossolúveis, deve utilizar-se como veículo água ou uma solução diluída de um tensioactivo não irritante. Nos restantes casos, o veículo deve consistir numa mistura etanol/água a 80 % (ensaios de indução) ou acetona (ensaios de desencadeamento).

1.5.2.3. Procedimento

1.5.2.3.1. Indução

Dia 0 — lote de ensaio

Remove-se o pêlo do flanco dos animais. O sistema de apósito é impregnado da substância em estudo, dissolvida ou suspensa num veículo adequado (deve justificar-se a escolha do veículo; as substâncias líquidas podem ser aplicadas sem diluição, se for caso disso)

e aplicado na zona de ensaio, sendo mantido em contacto com a mesma durante 6 horas, com o auxílio de um apósito ou de uma câmara e de um penso adequado.

▼B

O sistema de apósito utilizado deve ser oclusivo. Pode utilizar-se uma mecha de algodão de forma circular ou quadrada, com 4 a 6 cm^2. De modo a garantir a oclusão, é aconselhável utilizar um dispositivo de imobilização adequado. Caso se utilize uma faixa, poderá ser necessário proceder a exposições adicionais.

Dia 0 — lote de controlo

O pêlo é novamente removido da zona de ensaio. O veículo é aplicado de modo análogo ao anteriormente descrito, sendo também mantido em contacto com a referida zona durante 6 horas por intermédio de um penso oclusivo ou de uma câmara. Caso se conclua que não é necessário efectuar um controlo simulado, poderá efectuar-se um controlo mais simples.

6.º-8.º dias e 13.º-15.º dias — lotes de ensaio e de controlo

A substância em estudo é aplicada de modo análogo ao anteriormente descrito, na mesma zona e no mesmo flanco (se necessário, proceder à remoção do pêlo), entre o 6.º e o 8.º dias e, de novo, entre o 13.º e o 15.º dias.

1.5.2.3.2. Desencadeamento

27.º-29.º dias — lotes de ensaio e de controlo

Remove-se o pêlo do flanco posterior dos animais dos lotes de ensaio e de controlo não sujeito a exposição prévia e aplica-se um penso oclusivo ou câmara impregnados da quantidade adequada da substância em estudo (concentração máxima não irritante).

Se necessário, pode também aplicar-se um penso oclusivo ou câmara, impregnados do veículo, ao flanco anterior dos animais de ambos os lotes não sujeito a exposição prévia. Os pensos ou câmaras são mantidos em contacto com a pele durante 6 horas, com o auxílio de um dispositivo adequado.

1.5.2.3.3. Observação e avaliação

— Cerca de 21 horas após a remoção do apósito ou da câmara, remove-se o pêlo da área em estudo.

— Cerca de 3 horas depois (ou seja, cerca de 30 horas após o início do ensaio), observa-se a reacção cutânea, que se regista de acordo com a escala indicada em apêndice.

— Cerca de 24 horas após a primeira observação (54 horas após o início do ensaio), procede-se a um novo exame, cujos resultados se registam de modo análogo.

Recomenda-se a realização de leituras cegas com os animais dos lotes de ensaio e de controlo.

Caso seja necessário clarificar os resultados obtidos no primeiro ensaio de desencadeamento pode realizar-se um segundo ensaio com um novo lote de controlo, cerca de uma semana depois. Pode também realizar-se um segundo ensaio de desencadeamento com o mesmo lote de controlo.

▼B

Devem observar-se e registar-se de acordo com a escala de Magnusson/Kligman (ver apêndice) todas as reacções anormais, nomeadamente reacções sistémicas, resultantes dos processos de indução e desencadeamento. Além disso, podem efectuar-se outros exames, nomeadamente um exame histopatológico ou uma determinação da espessura da prega cutânea, com o objectivo de clarificar eventuais reacções duvidosas.

2. **DADOS (GPMT E ENSAIO DE BUEHLER)**

Os dados devem ser apresentados de forma sumária num quadro, referindo, para cada animal, a reacção cutânea observada.

3. **RELATÓRIO (GPMT E ENSAIO DE BUEHLER)**

Caso se tenha realizado um ensaio de prospecção (por exemplo, ensaio ganglionar local — LLNA — ou ensaio de tumefacção do pavilhão auditivo no ratinho — METS) antes do ensaio em porquinhos-da-índia, deve fornecer-se, juntamente com os resultados obtidos com a substância em estudo e a substância de referência, detalhes relativos ao procedimento.

Relatório do ensaio (ensaio de maximização em porquinhos da índia e ensaio de Buehler)

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

Animais utilizados no ensaio:

— estirpe;

— número, idade e sexo dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, dieta administrada, etc.;

— massa de cada animal no início do ensaio.

Condições de ensaio:

— pormenores relativos à preparação da zona de ensaio;

— pormenores relativos aos materiais e técnicas de apósito utilizadas;

— resultados dos estudos-piloto destinados a determinar as concentrações de indução e de desencadeamento utilizadas no ensaio;

— pormenores relativos à preparação, aplicação e remoção da substância em estudo;

— justificação da escolha do veículo;

— concentrações do veículo e da substância em estudo utilizadas nos ensaios de indução e de desencadeamento; quantidade total de substância aplicada nos ensaios de indução e de desencadeamento.

Resultados:

— resumo dos resultados do último controlo de sensibilidade e fiabilidade (ver 1.3), nomeadamente informações sobre a substância, a respectiva concentração e o veículo utilizado;

▼B

— dados relativos a cada animal, incluindo o sistema de classificação;

— descrição da natureza e gravidade dos efeitos observados;

— dados histopatológicos.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

O presente método é análogo ao método OCDE TG 406.

▼B

Apêndice

QUADRO

Escala de Magnusson/Kligman para a avaliação das reacções ao ensaio de desencadeamento

0 = alterações não visíveis;

1 = eritrema discreto ou localizado;

2 = eritrema moderado ou confluente;

3 = eritrema intenso e tumefacção.

▼M4

B.7 ESTUDO DA TOXICIDADE ORAL POR DOSE REPETIDA DURANTE 28 DIAS EM ROEDORES

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 407 (2008) da OCDE. O *Test Guideline* 407 inicial foi adotado em 1981. Em 1995, adotou-se uma versão revista, para obter mais dados sobre os animais estudados, nomeadamente ao nível da neurotoxicidade e da imunotoxicidade.

2. Em 1998, a OCDE deu início a uma ação prioritária com vista à revisão dos *Test Guidelines* existentes e à elaboração de novos *Test Guidelines* para despistagem e ensaio de potenciais desreguladores do sistema endócrino (8). Um dos elementos dessa ação foi a atualização do *Test Guideline* da OCDE relativo ao estudo da toxicidade oral por dose repetida durante 28 dias em roedores (TG 407), nele introduzindo parâmetros adequados à deteção da atividade endócrina de produtos químicos. O protocolo adotado foi então sujeito a um vasto programa internacional destinado a examinar a pertinência e viabilidade desses parâmetros adicionais, o desempenho dos mesmos relativamente a produtos químicos com atividade (anti)estrogénica, (anti)androgénica e (anti)tiroideia, a repetibilidade intralaboratorial e a reprodutibilidade interlaboratorial e as interferências dos novos parâmetros com os anteriormente previstos no TG 407. A OCDE elaborou em seguida um relatório muito completo (9) com a compilação e avaliação pormenorizada dos múltiplos dados obtidos nesse exercício. A presente atualização do método B.7 equivale ao TG 407 e é fruto da experiência e dos resultados obtidos durante o referido programa internacional. O método permite contextualizar determinados efeitos de mediação endócrina com outros efeitos toxicológicos.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

3. Na apreciação e avaliação das características de toxicidade de produtos químicos, pode determinar-se a toxicidade oral por dose repetida depois de obter informações sobre a toxicidade aguda a partir de ensaios realizados para o efeito. Este método destina-se ao estudo de efeitos tóxicos numa grande diversidade de alvos potenciais de toxicidade. Fornece informações sobre os perigos para a saúde que podem advir da exposição repetida num período relativamente curto, nomeadamente ao nível de efeitos nos sistemas nervoso, imunitário e endócrino. Nestes domínios específicos, pretende-se identificar os produtos químicos potencialmente neurotóxicos, passíveis de justificar o aprofundamento do estudo desta vertente, bem como os que interferem com a fisiologia da tiroide, podendo o método fornecer igualmente dados sobre os produtos químicos que afetam os órgãos reprodutores de animais adultos jovens de ambos os sexos e dar indicações sobre efeitos imunológicos.

4. Os resultados obtidos por este método podem ser utilizados na identificação de perigos e na avaliação de riscos. Os resultados correspondentes aos parâmetros relacionados com o sistema endócrino devem interpretar-se com base no documento "*Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*" (11), elaborado pela OCDE, que estabelece um quadro conceptual para o ensaio e a avaliação de produtos químicos desreguladores do sistema endócrino. O método compreende um estudo básico de toxicidade por dose repetida, que pode utilizar-se para produtos químicos que não justifiquem um estudo a 90 dias (por exemplo, se o volume de produção não exceder determinados limites) ou como etapa prévia para um estudo a longo prazo. O tempo de exposição previsto é de 28 dias.

▼M4

5. O programa internacional de validação de parâmetros adequados para a deteção da atividade endócrina potencial de produtos químicos mostrou que a qualidade dos dados obtidos pelo método B.7 depende muito da experiência do laboratório que realiza os ensaios. Este problema coloca-se especificamente em relação à determinação histopatológica de alterações cíclicas dos órgãos reprodutores femininos e à pesagem dos pequenos órgãos hormonodependentes, difíceis de dissecar. Foi elaborado um documento de orientações no domínio da histopatologia (19), que está disponível no sítio Web público da OCDE relativo aos *Test Guidelines* e visa ajudar os patologistas nos exames que realizam e contribuir para melhorar a sensibilidade do ensaio. Foram incorporados neste método diversos parâmetros que se verificou constituírem indicadores de efeitos tóxicos ao nível endócrino. Enumeram-se no apêndice 2, como parâmetros facultativos, aqueles cuja utilidade não está provada, por insuficiência de dados, ou cujo contributo para a deteção de desreguladores do sistema endócrino o programa de validação não demonstrou suficientemente.

6. Com base nos dados gerados no processo de validação, importa sublinhar que a sensibilidade deste ensaio não é suficiente para identificar todas as substâncias (anti)androgénicas ou (anti)estrogénicas (9). O método não é aplicado a um estádio da vida especialmente sensível à desregulação endócrina. Todavia, durante o processo de validação, identificaram-se por este método substâncias que afetam ligeira ou fortemente a função tiroideia e substâncias com atividade endócrina moderada a forte através dos recetores estrogénicos ou androgénicos, embora raramente tenha sido possível identificar substâncias com fraca atividade a esse nível. Não pode, portanto, considerar-se um ensaio de despistagem de atividade endócrina.

7. O facto de não se evidenciarem efeitos de natureza (anti)androgénica ou (anti)estrogénica não pode, portanto, entender-se como uma prova da inexistência de efeitos no sistema endócrino. No que respeita a efeitos mediados pelo sistema endócrino, a caracterização das substâncias não deve, pois, basear-se unicamente nos resultados obtidos por aplicação deste método de ensaio. Para caracterizar uma potencial atividade endócrina, estes resultados devem ser examinados juntamente com todos os dados disponíveis para o produto químico em causa, numa perspetiva de suficiência de prova. Por conseguinte, as decisões normativas sobre atividade endócrina (ao nível da caracterização de substâncias) devem fundamentar-se numa base mais alargada, não se apoiando unicamente nos resultados obtidos pelo presente método.

8. Pressupõe-se que todos os procedimentos com animais respeitarão as normas locais de manipulação de animais. As descrições, neste protocolo, dos cuidados a ter com os animais e do tratamento a dar aos animais são normas mínimas, prevalecendo, se for mais estrita, a regulamentação local. Para mais orientações sobre o tratamento ético de animais, ver o documento da OCDE com a referência 14.

9. Definem-se no apêndice 1 alguns conceitos utilizados.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

10. Administra-se diariamente por via oral o produto químico em estudo a vários grupos de animais, em doses crescentes de grupo para grupo, durante um período de 28 dias. No decurso deste período, verifica-se atentamente todos os dias se os animais evidenciam sinais de toxicidade. Autopsia-se os animais que morrem ou são eutanasiados durante os ensaios. No final dos ensaios, eutanasiam-se e autopsia-se os animais sobreviventes. Este estudo durante 28 dias fornece informações sobre os efeitos da exposição repetida por via oral e pode revelar a necessidade de estudos complementares mais longos. Pode igualmente fornecer informações que facilitem a escolha das

▼M4

concentrações a utilizar nesses estudos durante períodos mais longos. Os dados gerados pela aplicação deste método devem possibilitar a caracterização da toxicidade do produto químico estudado, fornecer indicações sobre a resposta às doses administradas e permitir determinar o NOAEL (nível sem observação de efeitos adversos).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

11. Embora possa recorrer-se a outros roedores, a espécie preferida é o rato. Se os parâmetros especificados neste método forem estudados noutra espécie de roedor, é necessário justificá-lo pormenorizadamente. Embora, em termos biológicos, seja plausível que outras espécies respondam aos produtos tóxicos de modo semelhante ao rato, o recurso a espécies mais pequenas pode aumentar a variabilidade, devido às dificuldades técnicas que a dissecação dos órgãos mais pequenos coloca. O rato foi a única espécie utilizada no programa internacional de validação da deteção de desreguladores do sistema endócrino. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas. A administração do produto químico em estudo deve ter início logo que possível após o desmame, mas sempre antes de os animais completarem nove semanas. No início do estudo, as diferenças de peso entre os animais utilizados devem ser mínimas, não se desviando mais de 20 % do peso médio de cada sexo. Se o estudo de toxicidade oral por dose repetida constituir uma etapa preliminar de um estudo a longo prazo, devem ser utilizados animais da mesma estirpe e proveniência em ambos os casos.

Condições de alojamento e de alimentação

12. Todos os procedimentos devem respeitar as normas locais de manipulação de animais de laboratório. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C (± 3 °C). A humidade relativa não deve ser inferior a 30 % e, de preferência, não deve exceder 70 %, exceto durante a limpeza do biotério. Idealmente, deve procurar manter-se entre 50 % e 60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições. Se o produto químico em estudo for administrado com os alimentos, a escolha da dieta pode ser condicionada pela necessidade de assegurar uma mistura adequada. Os animais devem ser alojados em pequenos grupos do mesmo sexo, embora possam ser alojados individualmente se houver razões científicas que o justifiquem. Em caso de alojamento coletivo, cada gaiola não deve alojar mais de cinco animais.

13. Deve efetuar-se com regularidade uma pesquisa de contaminantes nos alimentos fornecidos e conservar-se uma amostra da dieta até o relatório estar concluído.

Preparação dos animais

14. Distribuem-se aleatoriamente animais adultos, jovens e saudáveis pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Os animais devem ser identificados individualmente e permanecer nas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início do ensaio, para aclimatação às condições laboratoriais.

Preparação das doses

15. Administra-se o produto químico em estudo por meio de uma sonda esofágica ou através da dieta ou da água de beber. O método de administração oral depende do objetivo do estudo, bem como das propriedades físico-químicas e toxicocinéticas do produto químico em causa.

▼M4

16. Se necessário, pode suspender-se ou dissolver-se o produto químico em estudo num veículo apropriado. Recomenda-se que, sempre que possível, a primeira opção seja uma solução ou suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode optar-se por uma solução ou suspensão num óleo (por exemplo, em óleo de milho); em último caso, poderá recorrer-se a uma solução noutro veículo. Se o veículo utilizado não for água, é necessário conhecer as suas características de toxicidade. Deve determinar-se a estabilidade do produto químico em estudo no veículo utilizado.

PROCEDIMENTO

Número e sexo dos animais

17. Para cada dose, devem ser utilizados, pelo menos, 10 animais (cinco machos e cinco fêmeas). Se estiver prevista a realização de eutanásias intercalares, os efetivos devem ser aumentados no número de animais a eutanasiar antes da conclusão do estudo. Deve ponderar-se a constituição de um grupo satélite de dez animais (cinco de cada sexo) paralelamente ao grupo de controlo e ao grupo exposto à dose mais elevada, a fim de observar a reversibilidade, a persistência e o aparecimento diferido de efeitos tóxicos durante, pelo menos, 14 dias após o termo da exposição.

Dosagem

18. Em geral, devem ser utilizados pelo menos três grupos de ensaio e um grupo de controlo. Porém, se, após a avaliação de outros dados, não for de prever nenhum efeito com a dose de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia, pode efetuar-se um ensaio do limite. Se não se dispuser de dados adequados para o efeito, pode efetuar-se um estudo exploratório, com animais da mesma estirpe e proveniência, para facilitar a determinação das doses a utilizar. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos ensaiados. Se for utilizado um veículo para administrar o produto químico em estudo, o grupo de controlo deve receber o volume máximo de veículo utilizado.

19. Na escolha das doses devem ser tidos em conta os dados eventualmente disponíveis sobre a toxicidade e a toxicocinética do produto químico em estudo ou de produtos afins. Deve escolher-se como dose mais elevada uma dose que induza efeitos tóxicos, mas não cause mortalidade nem sofrimento intenso. Selecciona-se a seguir uma sequência decrescente de doses que permita correlacionar as respostas observadas com as doses administradas e cuja dose mais baixa não produza nenhum efeito adverso observável (NOAEL). O intervalo ótimo entre doses consecutivas é frequentemente definido por um fator de 2 a 4. A inclusão de um quarto grupo de ensaio é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes (fatores superiores a 10) entre as dosagens.

20. Caso se observem sinais de toxicidade generalizada (por exemplo, redução do peso corporal, efeitos ao nível hepático, cardíaco, pulmonar ou renal, etc.) ou outras alterações que possam não ser reações tóxicas (por exemplo, diminuição da quantidade de alimentos ingerida, dilatação hepática, etc.), deverá interpretar-se com cautela qualquer efeito observado ao nível dos parâmetros imunológicos, neurológicos ou endócrinos.

Ensaio do limite

21. Se o ensaio, realizado de acordo com o presente método, de uma dose não inferior a 1 000 mg/kg de peso corporal/dia ou, no caso da administração através da dieta ou da água de beber, de uma percentagem equivalente administrada através desses veículos (com base nos pesos corporais determinados) não produzir efeitos tóxicos observáveis e, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não forem de prever efeitos tóxicos, pode considerar-se que não é necessário efetuar um estudo completo com três doses. Nesses casos, justifica-se a realização de um ensaio do limite, exceto se os dados relativos à exposição humana aconselharem o ensaio de doses superiores.

▼M4

Administração das doses

22. Administra-se diariamente a dose prevista do produto químico em estudo aos animais durante 28 dias. A administração forçada por meio de uma sonda esofágica deve efetuar-se numa dose única, utilizando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal, não devendo exceder 1ml/100 g de peso corporal; excetuam-se as soluções aquosas, que podem ser administradas na proporção de 2 ml/100 g de peso corporal. Para minimizar as diferenças entre os volumes administrados, devem ser efetuados ajustes nas concentrações, de forma que o volume seja o mesmo para todas as doses; excetuam-se os ensaios de produtos químicos irritantes ou corrosivos, cujos efeitos são normalmente exacerbados a concentrações mais elevadas.

23. É importante assegurar que as quantidades do produto químico em estudo administradas através da dieta ou da água de beber não interferem na nutrição normal nem no equilíbrio hídrico. Se o produto químico em estudo for incorporado na dieta, pode optar-se por concentrações constantes nesta (ppm) ou por doses constantes em relação ao peso corporal de cada animal, devendo indicar-se a opção tomada. No caso dos produtos químicos administrados por sonda esofágica, a dose deve ser administrada todos os dias à mesma hora, devendo ser ajustada sempre que necessário para manter uma relação constante entre a dose administrada e o peso corporal do animal. Se o ensaio de toxicidade oral por dose repetida constituir uma etapa preliminar de um estudo a longo prazo, a dieta deve ser a mesma em ambos os casos.

Exames

24. O período de observação é de 28 dias. Os animais incluídos nos grupos satélites destinados a continuarem a ser observados devem ser mantidos durante, pelo menos, mais 14 dias sem administração do produto químico em estudo, para deteção do aparecimento diferido, da persistência ou da reversibilidade de efeitos tóxicos.

25. Pelo menos uma vez por dia, deve efetuar-se um exame clínico geral, de preferência sempre à(s) mesma(s) hora(s) e tendo em conta o período previsto de efeitos mais acentuados após a administração do produto químico em estudo, registando o estado de saúde dos animais. Pelo menos duas vezes por dia, verificam-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais.

26. Deve efetuar-se um exame clínico aprofundado a cada animal antes da primeira exposição (para poder fazer depois comparações com o estado inicial do animal) e, posteriormente, pelo menos uma vez por semana. Estes exames devem ser realizados fora das gaiolas, num recinto normalizado, de preferência sempre à mesma hora. Os resultados destes exames devem ser cuidadosamente registados, de preferência por recurso a um sistema de pontuação claramente definido pelo laboratório em causa. Deve zelar-se por que as condições de ensaio sejam o mais constantes possível e os exames devem ser efetuados, de preferência, por pessoal que não esteja a par do ensaio realizado. Entre os sinais a registar contam-se alterações da pele, da pelagem, dos olhos e das mucosas e a ocorrência de secreções, excreções ou reações neurovegetativas (por exemplo, lacrimação, horripilação, alterações da dimensão pupilar ou respiração anormal). Deve também registar-se qualquer alteração da maneira de o animal se mover, da postura e da reação à manipulação, bem como a ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e de comportamentos estereotipados (por exemplo, atos de higiene repetitivos ou movimentação repetitiva em círculo) ou estranhos (automutilação, movimentação para trás, etc.) (2).

27. Na quarta semana de exposição deve determinar-se a reação sensorial a diversos tipos de estímulos (2) (nomeadamente auditivos, visuais e proprioceptivos) (3)(4)(5) e avaliar-se a força de preensão (6) e a atividade motora (7). As referências indicadas contêm mais informações sobre a maneira de proceder em cada caso, embora possam adotar-se procedimentos distintos dos nelas descritos.

▼M4

28. Se o estudo constituir uma etapa preliminar de um estudo ulterior de toxicidade subcrónica (a 90 dias), podem ser omitidos os exames funcionais previstos para a quarta semana. Nesse caso, os exames funcionais devem realizar-se durante o estudo subsequente. Não obstante, os dados de exames funcionais realizados durante o estudo por dose repetida podem facilitar a escolha das doses a utilizar no estudo ulterior de toxicidade subcrónica.

29. Como segunda exceção, também podem omitir-se os exames funcionais no caso dos grupos de animais que apresentem sinais de toxicidade cuja intensidade interferiria de modo significativo com esses exames.

30. Na autópsia, pode determinar-se (facultativamente) a fase do ciclo estral de cada fêmea por meio de um esfregaço vaginal. Este exame fornece informações sobre a fase do ciclo estral no momento da eutanásia do animal e facilita a avaliação histológica dos tecidos sensíveis aos estrogénios – ver as orientações sobre histopatologia (19).

Peso corporal e consumo de alimentos e de água

31. Todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana. O consumo de alimentos deve ser medido pelo menos uma vez por semana. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, o consumo de água também deve medir-se pelo menos uma vez por semana.

Hematologia

32. No final do período de ensaio, devem determinar-se os seguintes parâmetros hematológicos: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, reticulócitos, contagem total de leucócitos e fórmula leucocitária, contagem de plaquetas e tempo e potencial de coagulação. Caso o produto químico em estudo ou os seus metabolitos potenciais tenham, ou se suspeite que tenham, propriedades oxidantes, devem ser efetuadas outras análises, nomeadamente a determinação da concentração de meta-hemoglobina e de corpos de Heinz.

33. As colheitas de sangue devem ser efetuadas num ponto determinado a indicar, imediatamente antes da eutanásia dos animais ou integradas nesta, e as amostras devem ser armazenadas em condições adequadas. Os animais devem jejuar na noite anterior à eutanásia ([1]).

Bioquímica clínica

34. Recorrendo a amostras de sangue de cada animal, colhidas imediatamente antes da eutanásia ou durante esta (com exceção dos animais moribundos e/ou eutanasiados antes do termo do estudo), devem ser efetuadas determinações bioquímicas clínicas destinadas a investigar os principais efeitos tóxicos nos tecidos, nomeadamente aos níveis renal e hepático. Os parâmetros a determinar no plasma ou no soro são os seguintes: sódio, potássio, glucose, colesterol total, ureia, creatinina, proteínas totais e albumina, pelo menos duas enzimas indicadoras de efeitos hepatocelulares (tais como a alanina-aminotransferase, a aspartato-aminotransferase, a fosfatase alcalina, a gama-glutamil-transpeptidase e a glutamato-desidrogenase) e os ácidos biliares. Em determinados casos, a determinação de outras enzimas (de origem hepática ou outra origem) e da bilirrubina pode fornecer informações úteis.

35. A título facultativo, podem realizar-se na última semana do estudo as seguintes determinações na urina, utilizando amostras recolhida em momentos determinados: aspeto, volume, osmolalidade ou densidade, pH, proteínas, glucose e sangue/hematócitos.

([1]) No caso de algumas determinações no soro e no plasma, nomeadamente da glucose, é aconselhável que os animais jejuem durante a noite. O principal motivo desta recomendação reside no facto de que a maior variabilidade dos resultados que inevitavelmente ocorreria se os animais não jejuassem poderia ocultar efeitos subtis e dificultar as interpretações. No entanto, por outro lado, o jejum durante a noite pode interferir no metabolismo geral dos animais e, particularmente nos estudos realizados com administração pela via alimentar, perturbar a exposição diária ao produto químico em estudo. Caso se opte pelo jejum durante a noite, as análises bioquímicas devem ser efetuadas após os exames funcionais previstos para a quarta semana do estudo.

▼M4

36. Deve ainda prever-se a pesquisa no plasma ou no soro de marcadores de lesões gerais dos tecidos. Caso as propriedades conhecidas do produto químico em estudo afetem, ou se suspeite de que possam afetar, determinadas vias metabólicas, devem realizar-se outras determinações, nomeadamente as seguintes: cálcio, fosfatos, triglicéridos, hormonas específicas e colinesterase. A necessidade de efetuar estas determinações é estabelecida para certas classes de produtos químicos ou é avaliada para cada caso concreto.

37. Embora na avaliação internacional dos parâmetros endócrinos não tenha ficado demonstrado ser claramente vantajoso determinar as hormonas tiroideias (T3 e T4) e a TSH, pode ser útil conservar amostras de plasma ou de soro para determinar (facultativamente) a T3, a T4 e a TSH, caso surjam indícios de efeitos no eixo hipofisotiroideio. Estas amostras podem ser congeladas a -20 °C para serem armazenadas. Os fatores a seguir indicados podem afetar a variabilidade dos resultados das análises hormonais e as concentrações absolutas nelas determinadas:

— momento da eutanásia, devido à variação das concentrações hormonais ao longo do dia,

— método utilizado para eutanasiar os animais sem lhes causar tensões desnecessárias, que poderiam afetar as concentrações hormonais,

— diferenças ao nível das curvas de calibração dos conjuntos (*kit*s) para as determinações hormonais.

É mais fiável recorrer a uma análise histopatológica do que à determinação de níveis harmonias para identificar inequivocamente os produtos químicos com atividade na tiroide.

38. As amostras de plasma especificamente destinadas a determinações hormonais devem colher-se à mesma hora do dia. Recomenda-se que se pondere a realização das análises da T3, da T4 e da TSH com base nas alterações histopatológicas detetadas na tiroide. Os conjuntos (*kits*) existentes no comércio para determinar concentrações hormonais podem dar valores diferentes. Pode, portanto, não ser possível estabelecer critérios de desempenho baseados em dados históricos homogéneos. Em alternativa, os laboratórios devem procurar manter os coeficientes de variação para efeitos de controlo abaixo de 25, no caso dos parâmetros T3 e T4, e abaixo de 35, no caso do parâmetro TSH. As concentrações devem ser registadas em ng/ml.

39. Se os dados históricos de base forem inadequados, deve ponderar-se a determinação da variabilidade dos parâmetros hematológicos e de bioquímica clínica antes de iniciar a exposição dos animais às doses previstas ou – o que será preferível – num conjunto de animais não incluídos nos grupos ensaiados.

PATOLOGIA

Autópsia macroscópica

40. Deve ser realizada a todos os animais estudados uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Removem-se convenientemente os tecidos aderentes ao fígado, aos rins, às glândulas suprarrenais, aos testículos, aos epidídimos, ao conjunto formado pela próstata, pelas vesículas seminais e pelas glândulas coagulantes, ao timo, ao baço, ao encéfalo e ao coração de todos os animais (exceto os moribundos e os que sejam eutanasiados antes do termo do estudo) e pesa-se cada um destes ainda húmido o mais rapidamente possível depois da dissecação, para evitar que seque. Ao remover os tecidos aderentes ao complexo prostático, há que tomar precauções para não perfurar as vesículas seminais, que têm líquido no interior. Em alternativa, podem remover-se os tecidos aderentes à próstata e às vesículas seminais e efetuar a pesagem depois de fixar estes órgãos.

▼M4

41. A título facultativo, podem pesar-se dois outros tecidos – para evitar que sequem, também o mais rapidamente possível depois da dissecação: os dois ovários (ainda húmidos) e o útero, incluindo o colo do útero – o documento TG 440 da OCDE (18) contém orientações sobre a dissecação e a preparação dos tecidos uterinos para a pesagem].

42. A pesagem (facultativa) da tiroide deve realizar-se após fixação. A remoção dos tecidos aderentes à tiroide deve efetuar-se com muito cuidado e também só depois da fixação, para evitar danificar tecidos – que, a ocorrer, poderia comprometer a análise histopatológica.

43. Os tecidos a seguir indicados devem conservar-se no meio de fixação mais adequado ao tipo de tecido e ao exame histopatológico previsto (ver o ponto 47): todas as lesões macroscópicas, o encéfalo (regiões representativas, incluindo os hemisférios cerebrais, o cerebelo e a protuberância anelar), a medula espinal, os olhos, o estômago, o intestino delgado e o intestino grosso (incluindo as placas de Peyer), o fígado, os rins, as glândulas suprarrenais, o baço, o coração, o timo, a tiroide, a traqueia e os pulmões (conservados por injeção de fixador, seguida de imersão), as gónadas (testículos e ovários), os órgãos sexuais secundários (útero e colo do útero, epidídimos, próstata + vesículas seminais e glândulas de coagulação), a vagina, a bexiga urinária, os gânglios linfáticos – o gânglio linfático mais próximo e outro gânglio linfático, a selecionar em função da experiência anterior do laboratório (15) –, um nervo periférico (ciático ou tibial), de preferência na vizinhança do músculo, músculo esquelético e osso com medula óssea (corte ou, em alternativa, uma punção recente de medula óssea). Recomenda-se a fixação dos testículos por imersão em fixador de Bouin ou em fixador de Davidson modificado (16)(17). Para que o fixador penetre rapidamente, deve puncionar-se superficialmente a túnica albugínea com uma agulha, com cuidado, em ambos os polos do órgão. Os resultados clínicos e outros podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem conservar-se também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indiciem que serão provavelmente afetados.

44. Os seguintes tecidos podem dar indicações úteis sobre efeitos ao nível do sistema endócrino: gónadas (ovários e testículos), órgãos sexuais secundários (útero, incluindo o colo do útero, epidídimos, vesículas seminais e glândulas de coagulação, bem como a próstata dorsolateral e ventral), vagina, hipófise, glândulas mamárias masculinas, tiroide e glândulas suprarrenais. Não há documentação suficiente de alterações das glândulas mamárias masculinas, mas este parâmetro pode ser muito sensível às substâncias com atividade estrogénica. A observação dos órgãos e tecidos não especificados no ponto 43 é facultativa (ver o apêndice 2).

45. O documento com a referência 19, que contém orientações no domínio da histopatologia, dá mais informações sobre a dissecação, a fixação, a colheita de amostras e a histopatologia de tecidos do sistema endócrino.

46. No programa de ensaios internacional obtiveram-se alguns indícios de que é possível detetar efeitos endócrinos subtis de produtos químicos capazes de afetar ligeiramente a homeostase das hormonas sexuais, não tanto com base em alterações histopatológicas claras dos órgãos sexuais femininos, mas sim através das perturbações que aqueles provocam na sincronização do ciclo estral em diversos tecidos. Embora esses efeitos careçam de prova definitiva, recomenda-se que, na interpretação do exame histopatológico dos ovários (células foliculares, tecais e da granulosa), do útero, do colo do útero e da vagina, se tenham em conta eventuais indícios de assincronias do ciclo estral. Caso se determine o estádio do ciclo por meio de esfregaços vaginais, este dado pode ser tido em conta como elemento comparativo suplementar.

▼M4

Histopatologia

47. Deve efetuar-se um exame histopatológico completo dos órgãos e tecidos conservados de todos os animais dos grupos de controlo e do grupo que recebeu a dose mais elevada. Caso o exame dos animais deste último grupo revele alterações atribuíveis à dose do produto químico em estudo, devem examinar-se também os animais de todos os outros grupos a que foram administradas doses do produto químico.

48. Devem examinar-se todas as lesões macroscópicas.

49. Caso se tenha constituído um grupo satélite de animais, deve efetuar-se o exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos grupos expostos a uma dose do produto químico em estudo.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

50. Devem ser apresentados todos os dados individuais. Os dados devem ainda ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais no início do ensaio, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados, a hora de cada morte ou eutanásia, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, os sinais de toxicidade observados, nomeadamente o momento do seu aparecimento e a sua duração e intensidade, o número de animais que apresentaram lesões, o tipo e a intensidade destas e a percentagem de animais que apresentaram cada tipo de lesão.

51. Se possível, devem ser avaliados os resultados numéricos por um método estatístico corrente adequado. Na comparação de um efeito numa gama de doses, deve evitar-se o recurso a múltiplos testes t. Os métodos estatísticos devem ser escolhidos no planeamento do estudo.

52. Para fins de controlo de qualidade, propõe-se a compilação de dados de controlo históricos e o cálculo de coeficientes de variação dos dados numéricos, especialmente no caso dos parâmetros relacionados com a deteção de desreguladores do sistema endócrino. Estes dados podem ser utilizados para fins comparativos quando da avaliação de estudos reais.

Relatório dos ensaios

53. Elementos a constar do relatório dos ensaios:

Produto químico em estudo:

— natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas,

— dados de identificação.

Veículo (se for o caso):

— justificação da escolha do veículo (se não for água).

Animais estudados:

— espécie e estirpe utilizadas,

— número, idade e sexo,

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.,

— peso de cada animal no início do ensaio,

— caso não sejam utilizados ratos, justificação da utilização de outra espécie.

Condições de realização dos ensaios:

— fundamentação da escolha das doses,

— elementos relativos à formulação do produto químico em estudo/à incorporação do mesmo na dieta dos animais; concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação,

▼M4

— elementos relativos à administração do produto químico em estudo,

— se aplicável, equivalência entre a concentração do produto químico em estudo na dieta ou na água de beber, expressa em ppm, e a dose real, expressa em mg/kg de peso corporal/dia,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água.

Parâmetros facultativos examinados:

— lista desses parâmetros.

Resultados:

— pesos corporais e alterações de peso corporal,

— consumo de alimentos e de água, se aplicável,

— respostas tóxicas em função do sexo e da dose administrada, incluindo sinais de toxicidade,

— natureza, intensidade e duração dos sinais clínicos observados (reversíveis ou irreversíveis),

— dados relativos à atividade sensorial, à força de preensão e à atividade motora,

— resultados das análises hematológicas, acompanhados dos respetivos valores de base,

— resultados das análises bioquímicas, acompanhados dos respetivos valores de base,

— pesos corporais no momento da eutanásia e pesos dos órgãos,

— resultados das autópsias,

— descrição pormenorizada dos resultados do exame histopatológico,

— dados de absorção, se disponíveis,

— tratamento estatístico dos resultados, se for o caso.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

▼M4

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Atividade antiandrogénica: capacidade de um produto químico de agir como hormona androgénica natural (por exemplo, a testosterona) num mamífero.

Atividade antiandrogénica: capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona androgénica natural (por exemplo, a testosterona) num mamífero.

Atividade antiestrogénica: capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona estrogénica natural (por exemplo, o estradiol 17ß) num mamífero.

Atividade antitiroideia: capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona da tiroide natural (por exemplo, a T_3) num mamífero.

Dosagem: termo geral que abrange a dose, a frequência desta e o tempo de aplicação da mesma.

Dose: quantidade de produto químico em estudo administrada. Exprime-se em peso diário do produto químico por unidade de peso corporal do animal ensaiado (por exemplo, mg/kg de peso corporal/dia) ou sob a forma de uma concentração constante na dieta.

Toxicidade evidente: termo geral que descreve a existência de sinais claros de toxicidade após a administração do produto químico em estudo. Os sinais em causa devem ser suficientes para a avaliação dos perigos e devem ser tais que seja de prever que o aumento da dose administrada provoque o aparecimento de sinais intensos de toxicidade e provável mortalidade.

NOAEL: abreviatura de "*no observed adverse effect level*" ("nível sem observação de efeitos adversos"), que constitui a dose máxima que não produz efeitos adversos observáveis da exposição à mesma.

Atividade estrogénica: capacidade de um produto químico de agir como hormona estrogénica natural (por exemplo, o estradiol 17ß) num mamífero.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

Atividade tiroideia: capacidade de um produto químico de agir como uma hormona da tiroide natural (por exemplo, a T_3) num mamífero.

Validação: processo científico concebido para caracterizar as limitações e os imperativos operacionais de um método de ensaio e para demonstrar a fiabilidade e pertinência do mesmo para um determinado fim.

▼M4

Apêndice 2

Parâmetros recomendados para a deteção de desreguladores do sistema endócrino pelo método B.7

Parâmetros obrigatórios	Parâmetros facultativos
Peso	
— Testículos — Epidídimos — Glândulas suprarrenais — Próstata + vesículas seminais e glândulas coagulantes	— Ovários — Útero, incluindo o colo do útero — Tiroide
Histopatologia	
— Gónadas — Testículos e — Ovários — Órgãos sexuais secundários: — Epidídimos — Próstata + vesículas seminais e glândulas coagulantes — Útero, incluindo o colo do útero — Glândulas suprarrenais — Tiroide — Vagina	— Esfregaço vaginal — Glândulas mamárias masculinas — Hipófise
Dosagens hormonais	
	— Níveis circulantes de T3 e T4 — Níveis circulantes de TSH

REFERÊNCIAS:

(1) OCDE (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the *ad hoc* Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

(2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(3) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40:999-1003.

(4) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol Environ. Health* 9:691-704.

(5) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108:267-283.

(6) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1:233-236.

▼M4

(7) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13:599-609.

(8) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10-11 de março de 1998. ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OCDE (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No. 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OCDE (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No. 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OCDE (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343, fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html.

(12) OCDE (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OCDE. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OCDE (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(15) Haley P., Perry R., Ennulat D., Frame S., Johnson C., Lapointe J.-M., Nyska A., Snyder P.W., Walker D., Walter G. (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. *Toxicol Pathol.* 33:404-407.

(16) Hess R.A., Moore B.J. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. *In*: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin R.E. e Heindel J.J. (eds.). Academic Press, San Diego, CA, p. 52-85.

(17) Latendresse J.R., Warbrittion A.R., Jonassen H., Creasy D.M. (2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30:524--533.

(18) OCDE (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N.º 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

(19) OCDE (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8. **TOXICIDADE SUBAGUDA POR INALAÇÃO: ESTUDO DE 28 DIAS**

RESUMO

Este método revisto visa caracterizar integralmente a toxicidade por via inalatória do produto químico estudado, após exposição repetida por um período limitado (28 dias), e obter dados para quantificar os riscos por inalação. Expõem-se durante 28 dias, seis horas por dia, grupos constituídos por dez roedores machos e dez roedores fêmeas a três ou mais concentrações do produto químico em estudo (a), a ar filtrado (b, controlo negativo), e/ou ao veículo (c, controlo do veículo). Em geral, Os animais são expostos durante cinco dias por semana, mas admite-se que sejam expostos sete dias por semana. Ensaiam-se sempre machos e fêmeas, mas cada sexo pode ser exposto a concentrações diferentes, se um deles for reconhecidamente mais sensível ao produto químico do que o outro. Este método concede ao diretor do estudo flexibilidade suficiente para incluir grupos satélites (para apreciação da reversibilidade), lavagens broncoalveolares, testes neurológicos e exames histopatológicos e de patologia clínica suplementares, a fim de melhor caracterizar a toxicidade do produto químico em estudo.

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 412 (2009) da OCDE. O *Test Guideline* 412 (TG 412) inicial relativo à toxicidade subaguda por inalação foi adotado em 1981 (1). O presente método B.8 é equivalente ao método TG 412 revisto, tendo sido atualizado para refletir o estado da ciência e cumprir exigências atuais e futuras da regulamentação.

2. O método permite caracterizar os efeitos adversos resultantes da exposição diária por inalação, durante 28 dias, ao produto químico em estudo. Os dados gerados pelos estudos de toxicidade subaguda por inalação durante 28 dias podem ser utilizados para quantificar riscos (caso não se lhes siga um estudo de toxicidade subcrónica por inalação a 90 dias — capítulo B.29 deste anexo). Os dados gerados pelo presente método também podem ser úteis para a escolha das concentrações a utilizar em estudos mais prolongados, por exemplo, o estudo da toxicidade subcrónica por inalação a 90 dias. O método não se destina especificamente ao ensaio de nanomateriais. No final do capítulo e no documento de orientações n.º 39 (2) são definidos alguns conceitos utilizados neste método.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

3. A fim de melhorar a qualidade do estudo e de minimizar a utilização de animais, antes de realizar o estudo o laboratório de ensaios deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa. Entre os elementos úteis para a escolha das concentrações mais adequadas contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, resultados de ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana, dados (Q)SAR — "*(quantitative) structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins e dados provenientes de ensaios de toxicidade aguda por inalação. Se estiver prevista a ocorrência ou ocorrerem manifestações de neurotoxicidade durante o estudo, fica ao critério do diretor deste incluir no estudo as avaliações suplementares que considere adequadas, tais como uma bateria de observações funcionais e determinações da atividade motora. Embora o momento da exposição possa ser um aspeto crítico em determinados exames, a realização destes estudos suplementares não deve interferir na conceção do estudo principal.

▼M4

4. No caso dos produtos químicos corrosivos ou irritantes, podem ser ensaiadas diluições adequadas, a concentrações que gerem o grau de toxicidade pretendido [ver o GD 39 (2)]. Ao expor animais a produtos químicos com tais características, as concentrações visadas devem ser suficientemente baixas para não causarem dor ou sofrimento intensos, sem deixarem de ser suficientes para que a curva de resposta à concentração abranja os níveis correspondentes aos objetivos do ensaio, nos planos científico e da regulamentação. Estas concentrações devem ser adaptadas a cada caso, de preferência com base num estudo exploratório convenientemente concebido, que forneça informações sobre o parâmetro crítico, eventuais limiares de irritação e o momento do aparecimento dos efeitos (ver os pontos 11 a 13). É necessário justificar as concentrações escolhidas em cada caso.

5. Os animais moribundos ou que apresentem sinais óbvios de dor ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados. Os animais moribundos são equiparados aos que morrem durante o ensaio. O documento de orientações da OCDE relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (3) define os critérios que devem presidir à decisão de eutanasiar animais moribundos ou em grande sofrimento, bem como orientações sobre o reconhecimento da morte previsível ou iminente.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

6. Devem ser utilizados roedores adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais de uso corrente. A espécie preferida é o rato. É necessário justificar o recurso a outras espécies.

Preparação dos animais

7. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas. No dia da seleção aleatória, os animais devem ser adultos jovens com sete a nove semanas, de peso corporal não desviado mais de 20 % do peso médio correspondente a cada sexo. Os animais são selecionados aleatoriamente, marcados para identificação individual e mantidos nas suas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início do ensaio, para aclimatação às condições laboratoriais.

Manutenção dos animais

8. É necessário identificar individualmente cada animal, se possível com um respondedor (*transponder*) subcutâneo, para facilitar as observações e evitar confusões. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. O ideal será manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, embora isto possa não ser possível ao utilizar água como veículo. Antes e depois das exposições, os animais são geralmente engaiolados por sexo e por concentração, mas o número de animais por gaiola não deve dificultar a clara observação de cada animal e deve minimizar as perdas devidas a lutas ou canibalismo. Quando se opta pela exposição unicamente nasal dos animais, pode ser necessário aclimatá-los aos tubos de contenção. Estes não devem provocar aos animais tensões físicas, térmicas ou dinâmicas excessivas. A contenção dos animais pode afetar parâmetros fisiológicos como a temperatura corporal (hipertermia) e/ou o volume respirado por minuto. Caso se disponha de dados genéricos reveladores de que nenhuma destas alterações ocorre em grau apreciável, não será necessária a adaptação prévia aos tubos de contenção. Os animais cujo corpo seja exposto na totalidade a um aerossol devem permanecer em gaiolas individuais durante a exposição, para evitar que o aerossol seja filtrado pela pelagem dos que com eles coabitem. Exceto nos períodos de exposição, podem utilizar-se dietas convencionais certificadas de laboratório, com fornecimento ilimitado de água potável da rede pública. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão.

▼M4

Câmaras de inalação

9. Ao escolher-se a câmara de inalação, deve ter-se em conta a natureza do produto químico em estudo e o objetivo do ensaio. Privilegia-se o modo de exposição unicamente nasal, termo que abrange as exposições "unicamente da cabeça", "unicamente do nariz" e "unicamente do focinho". A exposição unicamente nasal é geralmente preferida no estudo de aerossóis de líquidos ou de sólidos, ou de vapores que possam condensar-se e formar aerossóis. Para determinados objetivos do estudo, poderá ser melhor recorrer ao modo de exposição de corpo inteiro, mas será necessário justificá-lo no relatório. Para garantir estabilidade atmosférica nas câmaras de corpo inteiro, o volume de todos os animais presentes em cada câmara não deve exceder 5 % do volume da câmara. O documento GD 39 (2) descreve os princípios, vantagens e desvantagens das técnicas de exposição unicamente nasal e de corpo inteiro.

ESTUDOS DA TOXICIDADE

Concentrações-limite

10. Contrariamente aos estudos de toxicidade aguda, nos estudos de toxicidade subaguda por inalação a 28 dias não está definida nenhuma concentração--limite. Na escolha da concentração máxima a ensaiar, deve ter-se em conta a concentração máxima atingível, o nível de exposição humana mais desfavorável, a necessidade de manter um fornecimento adequado de oxigénio e/ou considerações de bem-estar animal. Se os dados disponíveis não permitirem estabelecer limites, podem utilizar-se os valores-limite de exposição aguda fixados no Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (13) – concentração máxima até 5 mg/l para aerossóis, 20 mg/l para vapores e 20 000 ppm para gases; ver igualmente o GD 39 (2). Se for necessário exceder estes limites ao ensaiar gases ou produtos químicos muito voláteis (por exemplo, refrigerantes), haverá que justificá-lo. A concentração-limite deve induzir efeitos tóxicos inequívocos sem gerar tensões desnecessárias nos animais nem afetar a longevidade dos mesmos (3).

Estudo exploratório

11. Antes de iniciar o estudo principal, pode ser necessário realizar um estudo exploratório. Um estudo exploratório com as características aqui definidas é mais completo do que um estudo preliminar, por não se limitar à escolha das concentrações. O êxito do estudo principal pode depender dos conhecimentos adquiridos num estudo exploratório. Este pode, por exemplo, fornecer informações técnicas sobre métodos de análise, granulometria, mecanismos de toxicidade, dados histopatológicos e de patologia clínica e estimativas do nível sem observação de efeitos adversos (NOAEL) e da concentração máxima tolerada no estudo principal. Fica ao critério do diretor do estudo recorrer a um estudo exploratório para determinar o limite mínimo de irritação do aparelho respiratório (por exemplo, por meio de uma histopatologia do aparelho respiratório, de testes da função pulmonar ou de uma lavagem broncoalveolar), a concentração máxima que os animais toleram sem tensões excessivas e os parâmetros que melhor caracterizam a toxicidade do produto químico em estudo.

12. O estudo exploratório pode abranger uma ou mais concentrações. A cada concentração, expõem-se, no máximo, três machos e três fêmeas. A duração deste estudo varia entrecinco dias, no mínimo, e geralmente não mais de 14 dias. É necessário justificar no relatório as concentrações escolhidas para o estudo principal. O objetivo deste último é demonstrar a existência de uma relação entre a concentração e a resposta obtida para o parâmetro previsivelmente mais sensível. Idealmente, a concentração mais baixa deve ser a concentração sem efeitos adversos observáveis e a concentração mais alta deve induzir efeitos tóxicos inequívocos, sem gerar tensões desnecessárias nos animais nem afetar a longevidade dos mesmos (3).

▼M4

13. Ao escolher os níveis de concentração para o estudo exploratório, devem ponderar-se todas as informações disponíveis, incluindo relações estrutura-atividade e dados relativos a produtos químicos semelhantes (ver o ponto 3). O estudo exploratório pode confirmar ou refutar a escolha dos parâmetros mais sensíveis segundo critérios mecanísticos, por exemplo, a inibição da colinesterase por organofosfatos, a formação de meta-hemoglobina por agentes eritrocitotóxicos, as hormonas tiroideias (T_3 e T_4), no caso dos agentes tirotóxicos, proteínas, a LDH, ou a presença de neutrófilos na lavagem broncoalveolar, no caso de partículas inócuas fracamente solúveis ou de aerossóis irritantes dos pulmões.

Estudo principal

14. Um estudo principal de toxicidade subaguda compreende geralmente três níveis de concentração, bem como, em paralelo, os controlos negativo (do ar) e/ou do veículo (ver o ponto 17). Para facilitar a seleção dos níveis de exposição, devem ser utilizados todos os dados disponíveis, nomeadamente resultados de estudos de toxicidade sistémica, metabólicos e cinéticos (deve ter-se especial cuidado em evitar níveis de concentração elevados que saturem os processos cinéticos). Cada grupo de ensaio compreende, pelo menos, a exposição de dez roedores (cinco machos e cinco fêmeas) ao produto químico em estudo, durante seis horas por dia e cinco dias por semana, ao longo de quatro semanas (a duração total do estudo é de 28 dias). Os animais também podem ser expostos sete dias por semana (por exemplo, ao ensaiar produtos farmacêuticos inalados). Se um dos sexos for reconhecidamente mais sensível ao produto químico em estudo, pode expor-se cada sexo a concentrações diferentes das utilizadas para o outro, a fim de otimizar a resposta à concentração como se refere no ponto 15. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Se a duração da exposição for inferior a seis horas por dia ou se for necessário realizar um estudo de exposição de longa duração (por exemplo, 22 horas por dia) de corpo inteiro [ver o GD 39 (2)], será necessário justificá-lo. Durante o período de exposição, a alimentação deve ser suspensa, exceto se a exposição exceder seis horas. Durante as exposições de corpo inteiro pode continuar a fornecer-se água.

15. As concentrações visadas escolhidas devem permitir identificar o(s) órgão(s)-alvo e evidenciar uma relação clara entre a concentração e a resposta obtida:

— o nível de concentração mais elevado deve gerar efeitos tóxicos, mas não causar sintomas deletérios nem mortalidade, que impediriam a interpretação dos resultados,

— o espaçamento do nível ou níveis de concentração intermédios deve permitir uma gradação dos efeitos tóxicos entre os correspondentes aos das concentrações mais baixa e mais elevada,

— o nível de concentração mais baixo não deve ter efeitos tóxicos ou, se os tiver, estes devem ser reduzidos.

Estudo em grupos satélites (para apreciação da reversibilidade)

16. Pode recorrer-se a um estudo satélite para observar a reversibilidade, a persistência ou o aparecimento diferido de efeitos tóxicos durante um período adequado, não inferior a 14 dias, após o termo da exposição. Compõem os grupos satélites cinco machos e cinco fêmeas, que são expostos ao mesmo tempo que os animais ensaiados no estudo principal. Os animais dos grupos satélites são expostos à concentração mais elevada do produto químico em estudo e devem ser complementados pelos grupos necessários de controlo do ar e/ou do veículo em paralelo (ver o ponto 17).

▼M4

Animais de controlo

17. Os animais de controlo negativo (do ar) em paralelo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos que participam no ensaio principal, exceto que são expostos a ar filtrado em vez de ao produto químico em estudo. Se for utilizada água ou outra substância para gerar a atmosfera ensaiada, deve incluir-se no estudo, em vez do grupo de controlo negativo (do ar), um grupo de controlo do veículo. Sempre que possível, o veículo utilizado deve ser água. Se assim for, os animais de controlo são expostos a ar com a mesma humidade relativa que o ar utilizado para os grupos expostos ao produto químico em estudo. A escolha do veículo mais adequado deve basear-se em dados históricos ou num estudo prévio convenientemente realizado. Se não se conhecer bem a toxicidade do veículo, fica ao critério do diretor do estudo utilizar em simultâneo um controlo negativo (do ar) e um controlo do veículo, embora se desaconselhe fortemente este procedimento. Se os dados históricos revelarem que o veículo não é tóxico, não haverá necessidade de um grupo de controlo negativo (do ar) e apenas deve utilizar-se um controlo do veículo. Se um estudo prévio de um produto químico incorporado num determinado veículo não revelar toxicidade, conclui-se que o veículo em causa não é tóxico à concentração ensaiada, devendo utilizar-se esse controlo do veículo.

CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Administração das concentrações

18. Os animais são expostos ao produto químico em estudo sob a forma de gás, vapor, aerossol ou de uma mistura destes. O estado físico a ensaiar depende das propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, da concentração escolhida e/ou da forma física cuja probabilidade de presença durante a manipulação e utilização do mesmo seja maior. Os produtos químicos higroscópicos ou quimicamente reativos devem ser ensaiados em atmosfera seca. Devem tomar-se precauções para evitar concentrações que possam provocar explosões. As matérias em partículas podem ser sujeitas a processos mecânicos para reduzir a granulometria. Para mais orientações, consultar o documento GD 39 (2).

Distribuição granulométrica

19. Os aerossóis e os vapores que possam condensar-se em aerossóis devem ser objeto de análise granulométrica. Para que todas as zonas pertinentes do aparelho respiratório sejam expostas, recomenda-se a utilização de aerossóis com diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) compreendido entre 1 μm e 3 μm e desvio-padrão geométrico (σ_g) compreendido entre 1,5 e 3,0 (4). Deve fazer-se o razoavelmente possível para respeitar estas condições, sendo necessário um parecer especializado caso isso não se consiga. Por exemplo, as partículas dos fumos metálicos podem ser mais pequenas do que o limite inferior indicado, ao passo que as partículas carregadas e as fibras podem exceder o limite superior.

Incorporação do produto químico em estudo num veículo

20. Idealmente, o produto químico em estudo deve ser ensaiado sem que tenha sido incorporado num veículo. Se for necessário utilizar um veículo para obter a concentração e a granulometria adequadas do produto químico em causa, deve preferir-se a água. Se o produto químico for dissolvido num veículo, será necessário comprovar que se mantém estável.

MONITORIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Caudal de ar nas câmaras

21. Durante cada exposição, é necessário regular cuidadosamente, monitorizar continuamente e registar pelo menos de hora a hora o caudal de ar através de cada câmara. A monitorização em tempo real da concentração (ou estabilidade no tempo) da atmosfera em estudo constitui uma medida permanente de todos os parâmetros dinâmicos e um meio indireto de regular os que têm importância para a inalação. Se a concentração for monitorizada

▼M4

em tempo real, pode reduzir-se a frequência da medição do caudal de ar a apenas uma medição diária por exposição. É necessário ter especial cuidado em evitar reinalações nas câmaras de exposição unicamente nasal. A concentração de oxigénio não deve ser inferior a 19 % e a concentração de dióxido de carbono não deve exceder 1 %. Se houver razões para crer que estas concentrações não são respeitadas, é necessário medi-las. Se as medições efetuadas no primeiro dia de exposição mostrarem que as concentrações destes gases estão aos níveis corretos, não é necessário voltar a medi-las.

Temperatura e humidade relativa nas câmaras

22. Deve manter-se a temperatura nas câmaras a 22 °C ± 3 °C. Tanto no caso das exposições unicamente nasais como das exposições do corpo inteiro, é necessário monitorizar continuamente a humidade relativa na zona de respiração dos animais e, se possível, registá-la de hora a hora durante cada exposição. É preferível manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, mas isso pode não ser possível (por exemplo, quando se estudam misturas aquosas) ou pode não ser mensurável (devido a interferências do produto químico em estudo com o método de ensaio).

Concentração nominal do produto químico em estudo

23. Sempre que possível, deve calcular-se e registar-se a concentração nominal na câmara de exposição. Esta é dada pela divisão da massa gerada do produto químico em estudo pelo volume de ar total que circulou pelo sistema da câmara de inalação. A concentração nominal não é utilizada para caracterizar a exposição dos animais, mas a sua comparação com a concentração real dá uma indicação da eficácia de geração do sistema de ensaio, podendo ser utilizada para detetar problemas a esse nível.

Concentração real do produto químico em estudo

24. Entende-se por "concentração real do produto químico em estudo", a concentração do produto químico nas amostras colhidas na zona de respiração dos animais da câmara de inalação. As concentrações reais podem determinar-se por métodos específicos (por exemplo, amostragem direta ou métodos de adsorção ou de reação química e posterior caracterização analítica) ou por métodos inespecíficos, tais como gravimetria após filtração. O método gravimétrico só é aceitável para aerossóis de pós com um único componente ou de líquidos pouco voláteis e deve apoiar-se em caracterizações adequadas específicas do produto químico em causa efetuadas antes da realização do estudo. A concentração de aerossóis de pós com vários componentes também pode determinar-se por gravimetria. Todavia, são necessários para isso dados analíticos que demonstrem que a composição do produto transportado no aerossol é semelhante à do produto inicial. Se não se dispuser desses dados, pode ser necessário reanalisar periodicamente o produto químico em estudo (idealmente no aerossol) durante o ensaio. No caso dos agentes aerossolizados que possam evaporar-se ou sublimar, é necessário demonstrar que todas as fases são recolhidas pelo método escolhido.

25. Deve utilizar-se, se possível, apenas um lote do produto químico em estudo durante os ensaios e a amostra em estudo deve ser conservada em condições que preservem a sua pureza, homogeneidade e estabilidade. Antes de iniciar o estudo, deve caracterizar-se o produto químico em causa no que respeita à sua pureza e, se tecnicamente viável, à sua identidade e às quantidades dos contaminantes e impurezas nele identificados. Para o efeito, pode recorrer-se, entre outros, aos seguintes dados: tempos de retenção e áreas relativas de picos, pesos moleculares obtidos por espetrometria de massa ou cromatografia em fase gasosa ou outras estimativas. Embora a identidade da amostra a estudar não seja da responsabilidade do laboratório, pode ser aconselhável que este confirme, pelo menos, alguns aspetos da caracterização efetuada pelo cliente (cor, natureza física, etc.).

▼M4

26. Deve manter-se a atmosfera de exposição tão constante quanto possível. Para demonstrar a estabilidade das condições de exposição, pode utilizar-se um dispositivo de monitorização em tempo real, tal como um fotómetro de aerossóis, para esses casos, ou, para vapores, um analisador de hidrocarbonetos totais. Deve medir-se a concentração real na câmara pelo menos três vezes por nível de exposição, em cada dia de exposição. Se isso não for viável, por limitações relacionadas com o caudal de ar ou devido a concentrações baixas, aceita-se uma amostra por período de exposição. Idealmente, essa amostra deve então ser colhida ao longo de todo o período de exposição. A concentração na câmara correspondente a uma determinada amostra não deve desviar-se da concentração média na câmara mais de 10 %, no caso de gases e vapores, nem mais de 20 %, no caso de aerossóis de líquidos ou de sólidos. Deve calcular-se e indicar-se no relatório o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio (t_{95}). A duração da exposição corresponde ao tempo de geração do produto químico em estudo, incluído o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio (t_{95}) e para o decaimento da concentração. O documento GD 39 (2) contém orientações para a estimativa do t_{95}.

27. No caso de misturas muito complexas de gases ou vapores e de aerossóis (por exemplo, atmosferas de combustão e produtos químicos gerados por produtos ou dispositivos finais específicos), o comportamento de cada fase na câmara de inalação pode ser diferente. Por esse motivo, deve escolher-se em cada fase (gás ou vapor e aerossol) pelo menos uma substância indicadora (substância analisada), normalmente a principal substância ativa da mistura. Se o produto químico em estudo for uma mistura, deve indicar-se no relatório a concentração analítica correspondente à mistura e não apenas a concentração correspondente ao ingrediente ativo ou à substância indicadora (substância analisada) em causa. O documento GD 39 (2) contém mais informações sobre as concentrações reais.

Distribuição granulométrica do produto químico em estudo

28. Deve determinar-se a distribuição granulométrica dos aerossóis pelo menos semanalmente por nível de concentração, recorrendo a um impactor de cascata ou a outro instrumento, tal como um granulómetro aerodinâmico. Se for possível demonstrar a equivalência dos resultados obtidos pelo impactor de cascata e pelo instrumento alternativo, pode utilizar-se este último em todo o estudo.

29. Em paralelo ao instrumento primário, deve utilizar-se um segundo dispositivo, tal como um filtro gravimétrico ou um borbulhador de gás/impactor *impinger*, para confirmar a eficiência de captação do primeiro. As concentrações mássicas obtidas por análise granulométrica e por análise com filtros não devem diferir entre si mais do que valores razoáveis [ver o GD 39 (2)]. Se for possível demonstrar esta equivalência, a todas as concentrações ensaiadas, no início do estudo, não é necessário efetuar mais medições de confirmação. Por razões de bem-estar animal, devem tomar-se medidas para minimizar dados inconclusivos que possam obrigar à repetição do estudo.

30. É necessário efetuar uma análise granulométrica no caso dos vapores que possam condensar-se para formar aerossóis ou se forem detetadas partículas numa atmosfera de vapores suscetível de formar fases mistas.

EXAMES

31. Os animais devem ser examinados clinicamente antes, durante e depois do período de exposição. Consoante a resposta dos animais durante a exposição, pode ser conveniente aumentar a frequência dos exames. Se for difícil examinar os animais devido aos tubos de contenção utilizados, à reduzida iluminação das câmaras de corpo inteiro ou à opacidade da atmosfera, deve-se examiná-los cuidadosamente depois da exposição. Os exames realizados antes da exposição do dia seguinte podem apreciar a eventual reversibilidade ou intensificação dos efeitos tóxicos.

▼M4

32. Todos os exames devem ser registados, mantendo registos individuais para cada animal. Se forem eutanasiados animais ou forem encontrados animais mortos, deve registar-se o momento da morte com a maior exatidão possível.

33. Os exames a efetuar aos animais engaiolados devem incidir, nomeadamente, nas alterações da pele e da pelagem, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do sistema circulatório, do sistema nervoso, da atividade somatomotora e do comportamento. Deve estar-se atento a tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. A medição da temperatura retal pode corroborar uma bradipneia reflexa ou uma hipo/hipertermia relacionadas com a exposição ou com o confinamento. Entre as avaliações suplementares que podem incluir-se no protocolo de estudo contam-se as de parâmetros cinéticos ou ao nível da biomonitorização, da função pulmonar, da retenção de matérias fracamente solúveis acumuladas no tecido pulmonar e de alterações comportamentais.

PESO CORPORAL

34. Regista-se o peso de cada animal pouco antes da primeira exposição (dia 0) e, em seguida, duas vezes por semana (por exemplo, às sextas-feiras e às segundas-feiras, para verificar a recuperação durante o fim de semana sem exposição, ou intervaladas de modo a possibilitar a avaliação da toxicidade sistémica), bem como no momento da morte ou da eutanásia. Se não se registarem efeitos nas duas primeiras semanas, durante o resto do estudo podem medir-se os pesos corporais apenas uma vez por semana. Os animais que integram os (eventuais) grupos satélites (para apreciação da reversibilidade) devem continuar a ser pesados semanalmente durante o período de recuperação. No termo do estudo, pesa-se cada animal pouco antes de ser eutanasiado, para não falsear o cálculo da relação entre o peso de cada órgão e o peso corporal.

CONSUMO DE ALIMENTOS E DE ÁGUA

35. Mede-se semanalmente o consumo de alimentos, podendo também medir-se o consumo de água.

PATOLOGIA CLÍNICA

36. Efetua-se uma avaliação de patologia clínica a todos os animais depois de eutanasiados, incluindo os dos grupos de controlo e dos grupos satélites (para apreciação da reversibilidade). Regista-se o lapso de tempo entre o termo da exposição e a colheita de sangue, em especial quando a reconstituição do parâmetro visado é rápida. Recomenda-se que, após o termo da exposição, sejam colhidas amostras para análise dos parâmetros com tempo de meia-vida plasmático curto – por exemplo, a carboxi-hemoglobina (COHb), a colinesterase (CHE), e a meta-hemoglobina (MetHb).

37. São enumerados no quadro 1 os parâmetros de patologia clínica normalmente exigidos nos estudos toxicológicos. A análise da urina não é exigida por rotina, mas pode efetuar-se quando a toxicidade prevista ou observada o aconselharem. Fica ao critério do diretor do estudo decidir avaliar outros parâmetros, para melhor caracterização da toxicidade do produto químico (por exemplo, colinesterase, lípidos, hormonas, equilíbrio ácido-base, meta-hemoglobina ou corpos de Heinz, creatinina-cinase, relação mieloide/ /eritroide, troponinas, gases no sangue arterial, lactato-desidrogenase, sorbitol-desidrogenase, glutamato-desidrogenase e gama-glutamil-transpeptidase).

▼M4

Quadro 1

Parâmetros clássicos de patologia clínica

Hematologia	
Contagem de eritrócitos	Contagem total de leucócitos
Hematócrito	Fórmula leucocitária
Concentração de hemoglobina	Contagem de plaquetas
Hemoglobina corpuscular média	Potencial de coagulação (escolher um):
Volume corpuscular médio	— tempo de protrombina
Concentração de hemoglobina corpuscular média	— tempo de coagulação
Reticulócitos	— tempo de tromboplastina parcial

Química clínica	
Glucose (*)	Alanina-aminotransferase
Colesterol total	Aspartato-aminotransferase
Triglicéridos	Fosfatase alcalina
Azoto ureico no sangue	Potássio
Bilirrubina total	Sódio
Creatinina	Cálcio
Proteínas totais	Fósforo
Albumina	Cloretos
Globulina	

Análise da urina (facultativa)	
Aspeto (cor e turvação)	Proteínas totais
Volume	Glucose
Densidade ou osmolalidade	Sangue/células sanguíneas
pH	

(*) Dado que um período longo de jejum pode distorcer as determinações da glucose dos animais expostos relativamente aos animais dos grupos de controlo, fica ao critério do diretor do estudo fazer ou não os animais jejuar. Se a opção for por um período de jejum, este deve ser adaptado à espécie – no caso do rato, pode ser de 16 horas (jejum noturno). Pode determinar-se a glucose em jejum após jejum noturno durante a última semana de exposição ou após jejum noturno antes da autópsia (neste caso, juntamente com todos os outros parâmetros de patologia clínica).

38. Se houver indícios de que a zona principal de deposição e retenção são as vias respiratórias inferiores (isto é, os alvéolos), a lavagem broncoalveolar pode ser a técnica mais adequada para efetuar uma análise quantitativa de parâmetros que hipoteticamente permitam avaliar a relação entre a dose e os efeitos por esta induzidos, com especial incidência para alveolites, inflamações pulmonares e fosfolipidose. Este processo permite estudar convenientemente os efeitos nos alvéolos das doses aplicadas e a evolução das lesões alveolares daí resultantes. Podem determinar-se no fluido da lavagem broncoalveolar a contagem total de leucócitos, a fórmula leucocitária, as proteínas totais e a lactato-desidrogenase. Outros parâmetros eventualmente a ponderar são os indicativos de alterações lisossómicas, fosfolipidose e fibrose, bem como de irritações e reações inflamatórias alérgicas, que podem compreender a determinação de citocinas ou quimiocinas pró-inflamatórias. As determinações no fluido proveniente da lavagem broncoalveolar complementam muitas vezes os exames histopatológicos, mas não os substituem. O documento GD 39 (2) contém orientações sobre a realização da lavagem pulmonar.

▼M4

MACROPATOLOGIA E PESO DO ÓRGÃOS

39. Os animais utilizados nos ensaios (incluindo os que morrerem durante o ensaio ou que forem eutanasiados e retirados do estudo por razões de bem-estar animal) devem ser completamente sangrados (se possível) e sujeitos a uma autópsia macroscópica. Deve registar-se o lapso de tempo entre o termo da última exposição de cada animal e o momento em que o animal é eutanasiado. Se não for possível realizar a autópsia imediatamente depois de detetada a morte do animal, este deve ser refrigerado (não congelado) a uma temperatura suficientemente baixa para minimizar a autólise. As autópsias devem ser efetuadas o mais rapidamente possível, normalmente não mais de um ou dois dias após a morte. Registam-se todas as alterações patológicas macroscópicas de cada animal, prestando especial atenção às alterações do aparelho respiratório.

40. Enumeram-se no quadro 2 os órgãos e tecidos a conservar num meio adequado, durante a autópsia macroscópica, para os exames histopatológicos. A preservação dos órgãos e tecidos indicados entre parênteses retos e de quaisquer outros não indicados fica ao critério do diretor do estudo. Os órgãos **indicados** a negrito devem ser separados dos tecidos aderentes e pesados ainda húmidos o mais rapidamente possível depois da dissecação, para evitar que sequem. A tiroide e os epidídimos só devem pesar-se se for necessário, porque os instrumentos utilizados para separar os tecidos aderentes podem comprometer a avaliação histopatológica. Logo depois da autópsia, fixam-se os tecidos e órgãos em formalina a 10 % tamponada ou com outro fixador adequado. A remoção dos tecidos aderentes só deve realizar-se 24 a 48 horas depois, consoante o fixador utilizado.

Quadro 2

Órgãos e tecidos a conservar durante a autópsia macroscópica

Glândulas suprarrenais Medula óssea (e/ou uma punção recente) **Encéfalo** (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/protuberância anelar) [Olhos (retina, nervo ótico) e pálpebras] **Coração** **Rins** Laringe (secção em três níveis, um dos quais compreendendo a base da epiglote) **Fígado** **Pulmões** (secção de cada lobo a um só nível, incluindo os brônquios principais) Gânglios linfáticos da região hilar dos pulmões, especialmente no caso de produtos químicos pouco solúveis que se apresentem sob a forma de partículas. Para exames e/ou estudos mais aprofundados de cariz imunológico, podem conservar-se outros gânglios linfáticos, nomeadamente os das regiões mediastinal, cervical/submandibular e/ou auricular. Tecidos nasofaríngeos (secção pelo menos em quatro níveis, um dos quais compreendendo o canal nasofaríngeo e os tecidos linfáticos associados à mucosa nasal — *"nasal associated lymphoid tissue",* NALT). Esófago [Bolbo olfativo] Ovários Vesículas seminais	Medula espinal (cervical, mediotorácica e lombar) **Baço** Estômago **Testículos** **Timo** Tiroide Traqueia (secção pelo menos em dois níveis, incluindo uma secção longitudinal na carina e uma secção transversal) [Bexiga urinária] Útero Todas as lesões macroscópicas

▼M4

41. Os pulmões são removidos intactos, pesados e instila-se-lhes um fixador adequado, à pressão de 20 a 30 cm de coluna de água, para conservar a estrutura pulmonar (5). Secciona-se cada lobo a um só nível (incluindo os brônquios principais); caso se proceda a lavagem pulmonar, secciona-se o lobo não lavado em três níveis (não sequenciais).

42. São examinados pelo menos quatro níveis dos tecidos nasofaríngeos, um dos quais deve compreender o canal nasofaríngeo (5)(6)(7)(8)(9), para possibilitar um exame adequado do epitélio escamoso, de transição (respiratório não ciliado), respiratório (respiratório ciliado) e olfativo, assim como o tecido linfático adjacente — NALT (10)(11). São examinados e três níveis da laringe, um dos quais deve incluir a base da epiglote (12). São examinados pelo menos dois níveis da traqueia, incluindo uma secção longitudinal na carina da bifurcação que dá origem aos brônquios extrapulmonares e uma secção transversal.

HISTOPATOLOGIA

43. Deve efetuar-se uma avaliação histopatológica dos órgãos e tecidos indicados no quadro 2 a cada animal do grupo com a concentração mais elevada e dos grupos de controlo, bem como aos animais que morrerem ou forem eutanasiados durante o estudo. Deve prestar-se especial atenção ao aparelho respiratório, aos órgãos-alvo e às lesões macroscópicas. Os órgãos e tecidos que apresentem lesões nos animais do grupo com a concentração mais elevada devem ser examinados em todos os grupos. Fica ao critério do diretor do estudo efetuar avaliações histopatológicas a outros grupos, para evidenciar uma resposta clara à concentração. Caso se tenha constituído um grupo satélite de animais (para apreciação da reversibilidade), deve efetuar-se o exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos outros grupos expostos. Se o número de mortes prematuras ou outros problemas no grupo com a concentração mais elevada for excessivo, a ponto de comprometer a significância dos dados, efetua-se um exame histopatológico dos animais expostos ao nível de concentração imediatamente inferior. Deve procurar-se estabelecer correlações entre as observações macroscópicas e os resultados dos exames microscópicos.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

44. Devem ser apresentados dados por animal relativos a peso corporal, consumo alimentar, patologias clínicas, macropatologias, peso dos órgãos e histopatologias. Devem ser resumidos os resultados dos exames clínicos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentaram sinais específicos de toxicidade, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados e o momento da morte de cada animal, complementados por uma descrição dos efeitos tóxicos e da evolução e reversibilidade destes, bem como pelos resultados das autópsias. Os resultados, quantitativos ou outros, devem ser avaliados por um método estatístico adequado. Os métodos estatísticos devem ser escolhidos no planeamento do estudo, podendo sê-lo qualquer método estatístico corrente adequado.

Relatório dos ensaios

45. Elementos a constar, quando pertinente, do relatório dos ensaios:

Animais estudados e condições em que são mantidos

— descrição das condições de engaiolamento, nomeadamente: número (ou alteração do número) de animais por gaiola, camas, temperatura e humidade relativa ambientes, fotoperíodo e dieta,

▼M4

— espécie e estirpe utilizadas e, caso não sejam utilizados ratos, justificação da utilização de outra espécie. Podem apresentar-se dados originários da proveniência dos animais ou dados históricos, desde que correspondentes a animais sujeitos às mesmas condições de exposição, alojamento e jejum,

— número, idade e sexo,

— método de aleatorização,

— descrição de eventuais condicionamentos anteriores ao ensaio, nomeadamente ao nível da dieta, de quarentenas e do tratamento de doenças.

Produto químico em estudo

— natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas pertinentes (incluindo a isomerização),

— dados de identificação e, se for conhecido, número de registo CAS (*Chemical Abstract Service*).

Veículo

— justificação da utilização e da escolha do veículo (se não for água),

— dados históricos ou paralelos demonstrativos de que o veículo não interfere nos resultados do estudo.

Câmaras de inalação

— descrição pormenorizada – incluindo o volume e um esquema – das câmaras de inalação,

— origem e descrição do equipamento utilizado na exposição dos animais e na geração da atmosfera,

— equipamento de medição da temperatura, humidade, granulometria e concentração real,

— fonte de ar e sistema de climatização utilizado,

— métodos utilizados para calibrar o equipamento a fim de garantir a homogeneidade da atmosfera ensaiada,

— subpressão ou sobrepressão,

— pontos de exposição por câmara (de exposição unicamente nasal); localização dos animais na câmara (câmara de exposição de corpo inteiro),

— estabilidade da atmosfera utilizada nos ensaios,

— localização nas câmaras dos sensores térmicos e higrométricos e dos pontos de colheita de amostras da atmosfera ensaiada,

— tratamento do ar fornecido/evacuado,

— caudais de ar, caudal de ar em cada ponto de exposição (exposição unicamente nasal) ou relação entre o volume ocupado pelos animais e o volume da câmara (câmara de exposição de corpo inteiro),

— tempo necessário para as câmaras de inalação atingirem o equilíbrio (t95),

— número horário de substituições de volume,

— medidores (se existirem).

Elementos relativos à exposição

— fundamentação da escolha da concentração visada no estudo principal,

▼M4

— concentrações nominais (dadas pela divisão da massa do produto químico em estudo introduzido na câmara de inalação pelo volume de ar total que nela circulou),

— concentrações reais do produto químico em estudo obtidas na zona de respiração dos animais; no caso das misturas que geram formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerossóis), pode analisar-se separadamente cada uma delas,

— as concentrações no ar devem indicar-se em unidades de massa (mg/l, mg/m^3, etc.) e não de volume (ppm, ppb, etc.),

— distribuição granulométrica, diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) e desvio-padrão geométrico (σ_g), incluindo os métodos de cálculo correspondentes; indicar também o resultado de cada análise granulométrica efetuada.

Condições de realização dos ensaios

— elementos sobre a preparação do produto químico estudado, nomeadamente sobre eventuais métodos de redução da granulometria de sólidos ou de preparação de soluções do produto químico,

— descrição (de preferência complementada por um esquema) do equipamento utilizado para gerar a atmosfera dos ensaios e para expor os animais a essa atmosfera,

— elementos relativos ao equipamento de monitorização da temperatura, humidade e caudal de ar nas câmaras (curvas de calibração),

— elementos relativos ao equipamento utilizado para colher as amostras para determinação da granulometria e da concentração nas câmaras,

— elementos sobre o método de análise química utilizado e sobre a validação desse método (incluindo o rendimento da recuperação do produto químico em estudo do meio amostrado),

— método utilizado para distribuir aleatoriamente os animais pelos grupos ensaiados e pelos grupos de controlo,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— fundamentação da escolha das concentrações utilizadas nos ensaios.

Resultados

— quadro com a temperatura, a humidade e o caudal de ar nas câmaras,

— quadro com as concentrações nominais e reais nas câmaras,

— quadro com os dados granulométricos, nomeadamente dados analíticos sobre a colheita de amostras, a distribuição granulométrica e os cálculos de MMAD e σ_g,

— uadro com os dados de resposta e as concentrações correspondentes a cada animal (animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, e natureza, intensidade, momento do aparecimento e duração dos efeitos),

▼M4

— quadro com os pesos de cada animal,

— quadro dos consumos alimentares,

— quadro dos dados de patologia clínica,

— resultados da autópsia e resultados histopatológicos correspondentes a cada animal, se disponíveis,

— quadros dos restantes parâmetros medidos.

Discussão e interpretação dos resultados

— deve ser dada especial atenção à descrição dos métodos utilizados para satisfazer os critérios deste método de ensaio, nomeadamente no que respeita à concentração-limite e à granulometria,

— examinar em que medida, com base nos resultados globais, as partículas são respiráveis, em especial se os critérios granulométricos não forem satisfeitos,

— a apreciação global do estudo deve incidir igualmente na coerência dos métodos utilizados para determinar as concentrações nominal e real e deve dar conta da relação entre estas concentrações,

— referir a causa provável da morte e o modo de ação predominante (sistémico ou local),

— explicar por que razão terá sido necessário eutanasiar animais que apresentavam sinais de dor ou de grande sofrimento continuado com base nos critérios do documento de orientações da OCDE relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (3),

— identificar o(s) órgão(s)-alvo,

— determinar o NOAEL e o LOAEL (nível mínimo com observação de efeitos adversos).

REFERÊNCIAS:

(1) OCDE (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412. Environment Directorate, OCDE, Paris.

(2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

(4) Whalan J.E., Redden J.C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) *in* Toxicology of Inhaled Material. Witschi, H.P. e Brain, J.D. (eds.). Springer Verlag Heidelberg, p. 229-258.

(6) Young J.T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1:309-312.

(7) Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ. Health Perspect.* 85:231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. *In* Waalkes M.P. e Ward J.M. (eds.) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22:353-372.

(10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13:219-224.

(11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141:281-285.

(12) Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3):419-428.

(13) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

Apêndice 1

DEFINIÇÃO

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼B

B.9. **TOXICIDADE (DÉRMICA) DA DOSE REPETIDA (28 DIAS)**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

Ver Introdução Geral parte B (ponto A).

1.2. DEFINIÇÕES

Ver Introdução Geral, parte B (ponto B).

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Administra-se à pele diariamente a substância de ensaio, em doses graduadas, a diversos grupos de animais de experiência, utilizando-se uma dose por grupo durante um período de 28 dias. Durante o período de administração observa-se os animais diariamente para se detectar manifestações de toxicidade. Faz-se a autópsia dos animais mortos durante o ensaio e no final do ensaio faz-se também a autópsia dos animais que sobreviveram ao teste.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Nenhum.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Preparativos**

Os animais são mantidos sob as condições de alojamento e alimentação experimentais durante pelo menos cinco dias antes do ensaio. Antes do ensaio procede-se a uma escolha aleatória de animais adultos, jovens e saudáveis e que são distribuídos por grupos de tratamento. Pouco tempo antes de se iniciar o ensaio rapa-se os pêlos da região dorsal dos animais. No caso de se recorrer à tosquia esta deverá ser efectuada aproximadamente 24 horas antes do ensaio. 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 de ensaio não poderá ser inferior a 10 % da superfície corporal. O peso do animal deverá ser tomado em consideração na decisão da zona a expor e da dimensão da superfície a tratar. Sempre que se procede ao ensaio de substâncias sólidas, as quais podem ser pulverizadas se necessário, a substância de ensaio deve ser humedecida com água ou com um veículo apropriado para garantir um bom contacto com a pele. As substâncias de ensaio líquidas são geralmente utilizadas sem serem diluídas. Procede-se a uma aplicação diária durante cinco a sete dias por semana.

1.6.2. **Condições da experiência**

1.6.2.1. *Animais de experiência*

Podem ser utilizados ratos adultos, coelhos ou cobaias. Outras espécies poderão ser utilizadas mas a sua utilização deverá ser justificada.

▼B

No início da experiência a diferença de peso entre os animais não poderá ultrapassar ± 20 % do peso médio apropriado.

1.6.2.2. *Número e sexo*

Para cada grupo de ensaio serão utilizados pelo menos 10 animais (cinco fêmeas e cinco machos) com pele saudável. As fêmeas deverão ser nulíparas e não grávidas. Se for previsível sacrificar alguns animais durante a experiência, deve acrescentar-se ao número inicial o número de animais que se prevê vir a sacrificar. Para além destes, poderá haver um grupo-satélite de 10 animais (cinco animais de cada sexo) tratado com a dose mais elevada durante 28 dias e observado quanto à reversibilidade, persistência ou aparecimento tardio de efeitos tóxicos durante 14 dias após o tratamento. Utiliza-se também um grupo-satélite de 10 animais de controlo (cinco animais de cada sexo).

1.6.2.3. *Doses*

São necessárias pelo menos três doses diferentes com um controlo ou com um veículo de controlo no caso de ser utilizado um veículo. O período de exposição deverá ser no mínimo de seis horas por dia. A substância de ensaio será aplicada diariamente à mesma hora e a quantidade a administrar será ajustada regularmente (semanal ou bissemanalmente) de modo a manter-se constante relativamente ao peso corporal do animal. Os animais do grupo de controlo serão tratados da mesma maneira que os animais dos grupos de experiência, com excepção da aplicação da substância de ensaio. No caso de 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. No caso de se dispor 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 observado. No caso de se utilizar 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 nos grupos de controlo, a incidência da mortalidade deverá ser baixa para permitir uma avaliação significativa dos resultados.

No caso de a aplicação da substância de ensaio provocar uma grave irritação cutânea, dever-se-á reduzir 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.

1.6.2.4. *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.

1.6.2.5. *Período de observação*

Os animais da experiência serão observados diariamente para se detectar manifestações de toxicidade. Proceder-se-á ao registo do momento da morte e do momento do aparecimento e do desaparecimento das manifestações de toxicidade.

▼B

1.6.3. **Procedimento**

Os animais serão colocados em gaiolas individuais. Em condições ideais a substância de ensaio será administrada aos animais sete dias por semana durante um período de 28 dias. Os animais de todos os grupos-satélite que forem objecto de observações complementares serão mantidos vivos durante mais 14 dias, sem tratamento, para se detectar a recuperação ou a persistência dos efeitos tóxicos. O tempo de exposição será pelo menos de seis horas por dia.

A substância de ensaio 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 de ensaio é mantida em contacto com a pele por meio de uma gaze porosa e de um adesivo antialérgico. A superfície tratada será por sua vez convenientemente coberta de maneira a manter no seu lugar a gaze e a substância de ensaio e de modo a evitar que os animais ingiram a referida substância. É possível utilizar aparelhos de contenção para evitar a ingestão da substância, mas não se recomenda a imobilização completa. Como alternativa pode utilizar-se uma «coleira de protecção».

No fim do tempo de exposição é necessário, se possível, eliminar todos os resíduos da substância utilizando água ou recorrendo a qualquer outro método adequado para limpeza da pele.

Os animais serão observados diariamente, registando-se sempre as manifestações de toxicidade assim como o momento do seu aparecimento, a sua intensidade e a sua duração. Proceder-se-á à observação das modificações do pêlo e da pele, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do aparelho circulatório, do sistema nervoso autónomo e central, assim como da actividade somatomotora e do comportamento. Determinar-se-á semanalmente o peso dos animais. Recomenda-se também que se determine semanalmente o consumo alimentar. Deve observar-se regularmente os animais para se evitar perdas, tanto quanto possível, causadas por 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 e os animais que apresentem graves sintomas de angústia ou dor deverão ser imediatamente retirados, sacrificados e submetidos a autópsia.

Os exames a seguir enunciados deverão ser efectuados no fim do período de ensaio para todos os animais incluindo os de controlo:

1. Um exame hematológico compreendendo os seguintes testes: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem de leucócitos, fórmula leucocitária, bem como um estudo sobre o potencial de coagulação.

2. A determinação de dados bioquímicos do sangue incluindo pelo menos um parâmetro da função hepática e renal: alanina aminotransferase (inicialmente conhecida como transaminase glutâmico-pirúvica), aspartato aminotransferase (inicialmente conhecida como transaminase glutâmico-oxalo-acética), azoto ureico, albumina, creatinina plasmática, bilirrubina total e as proteínas séricas totais.

As outras análises eventualmente necessárias para uma avaliação toxicológica adequada incluem as análises de cálcio, fósforo, cloretos, sódio, potássio, glicose em jejum, análises de lípidos, de hormonas, equilíbrio ácido-básico, meta-hemoglobina e actividade colinesterásica.

▼B

Pode recorrer-se a outras análises bioquímicas clínicas sempre que necessário para melhorar a investigação dos efeitos observados.

1.6.4. **Autópsia**

Todos os animais submetidos a experiência deverão ser submetidos a uma autópsia geral. Pelo menos o fígado, os rins, as glândulas supra-renais e os testículos deverão ser pesados ainda húmidos, tão cedo quanto possível após a dissecação para se evitar a perda de líquidos por evaporação. Todos os órgãos e tecidos, isto é, pele normal e tratada, fígado, rins, baço, testículos, glândulas supra-renais, coração e órgãos-alvo (isto é, os órgãos que apresentem lesões graves ou variações de volume) deverão ser conservados num meio adequado para eventual exame histopatológico futuro.

1.6.5. **Exame histopatológico**

No grupo tratado com a dose mais elevada e no grupo de controlo deve efectuar-se o exame histológico dos órgãos e tecidos conservados. Os órgãos e tecidos que apresentem efeitos susceptíveis de serem atribuídos à substância de ensaio administrada na dose mais elevada deverão ser examinados em todos os grupos tratados com doses inferiores. Deve proceder-se a um exame histológico dos animais de qualquer grupo-satélite com particular ênfase sobre os órgãos e tecidos que apresentaram efeitos identificados nos outros grupos tratados.

2. **RESULTADOS**

Os resultados serão resumidos na forma de quadros indicando, para cada experiência, o número de animais no início do ensaio e o número de animais que apresenta cada tipo de lesão.

Todos os resultados observados deverão ser avaliados por um método estatístico apropriado. Pode ser utilizado qualquer método estatístico reconhecido.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

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

— dados sobre os animais (espécie, estirpe, origem, condições ambientais, dieta, etc.),

— condições experimentais (incluindo o tipo de cobertura: oclusiva ou não oclusiva),

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

— dose sem efeito, se possível,

— resposta tóxica por sexo e por dose,

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

— efeitos tóxicos ou outros,

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

— dados relativos à alimentação e peso corporal,

— exames hematológicos efectuados e resultados,

▼B

— provas bioquímicas clínicas utilizadas e seus resultados,

— resultados da autópsia,

— descrição pormenorizada de todos os resultados histopatológicos,

— tratamento estatístico dos resultados, se possível,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B (ponto D).

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução Geral, parte B (ponto E).

▼B

B.10. MUTAGENICIDADE — ENSAIO *IN VITRO* DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM MAMÍFEROS

1. MÉTODO

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 473 — Ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas em mamíferos (1997).

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo do ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas é identificar os agentes que causam aberrações estruturais dos cromossomas em culturas de células de mamíferos (1) (2) (3). As aberrações estruturais podem ser de dois tipos, afectando os cromossomas ou os cromatídeos. A maior parte dos mutagéneos químicos induzem aberrações cromatídicas, mas também podem ocorrer aberrações cromossómicas. Um aumento da taxa de poliploidia pode indicar que um determinado produto químico tem potencial para induzir aberrações numéricas. Contudo, este método não foi concebido para medir as aberrações numéricas nem é normalmente utilizado com esse objectivo. As mutações nos cromossomas e eventos relacionados causam diversas doenças genéticas humanas, existindo provas substanciais de que as alterações que causam nos oncogenes e nos genes supressores de tumores das células somáticas estão envolvidas na indução de cancro nos seres humanos e em animais utilizados em experiências.

O ensaio *in* vitro de aberrações cromossómicas pode envolver culturas de linhas celulares bem estabelecidas, de uma determinada estirpe ou ainda culturas de células primárias. As células utilizadas são seleccionadas com base na sua capacidade de crescimento em cultura, na estabilidade do cariótipo, no número e diversidade dos seus cromossomas e na frequência das aberrações cromossómicas espontâneas.

Os ensaios *in vitro* exigem geralmente a utilização de uma fonte exógena de activação metabólica, que não consegue imitar inteiramente as condições *in vivo* nos mamíferos. Deve ter-se o cuidado de evitar condições que conduzam a resultados positivos que não sejam reflexo de uma mutagenicidade intrínseca mas que possam resultar, por exemplo, de mudanças do pH, da pressão osmótica ou ainda de níveis elevados de citotoxicidade (4) (5).

O presente ensaio é utilizado para a análise de agentes eventualmente mutagéneos ou carcinogéneos para os mamíferos. Muitos dos compostos que dão um resultado positivo no presente ensaio são carcinogéneos nos mamíferos, não existindo, contudo, uma correlação perfeita entre o ensaio e a carcinogenicidade. A correlação depende da classe química e existem cada vez mais provas de que alguns agentes carcinogéneos não são detectados por este ensaio, por os seus mecanismos de actuação não passarem directamente pela danificação do ADN.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

Aberração cromatídica: lesão estrutural de um cromossoma expressa na ruptura, ou na ruptura seguida de união, de cromatídeos simples.

Aberração cromossómica: lesão estrutural de um cromossoma expressa na ruptura, ou na ruptura seguida de união, de ambos os cromatídeos no mesmo local.

▼B

Endorreduplicação: processo mediante o qual, na sequência de um período S de replicação do ADN, o núcleo não sofre mitose, iniciando-se um novo período S, que resulta em cromossomas com 4, 8, 16, ... cromatídeos.

Lacuna: lesão acromática de extensão inferior à largura de um cromatídeo e que determine um ligeiro desalinhamento do mesmo.

Índice mitótico: relação entre o número de células em metafase e o número total de células observadas numa população de células, que fornece uma indicação do grau de proliferação da população em causa.

Aberração numérica: alteração do número de cromossomas relativamente ao número de cromossomas característico das células utilizadas.

Poliploidia: número de cromossomas múltiplo do número haplóide (n), mas diferente do número diplóide (ou seja, 3n, 4n, etc.).

Aberração estrutural: alteração da estrutura dos cromossomas detectável por exame microscópico das células em metafase, na forma de supressão de segmentos, de alterações de partes da sequência ou da troca de segmentos num cromatídeo ou entre cromatídeos.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

As culturas celulares são expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica. Após um período determinado, adiciona-se um produto fixador da metafase (por exemplo, Colcemid® ou colchicina); as células são colhidas, coradas e analisadas microscopicamente para detectar a presença de aberrações cromossómicas nas células em metafase.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Preparação**

1.4.1.1. *Células*

Podem utilizar-se diversas linhas celulares, estirpes ou culturas celulares primárias, incluindo células humanas (por exemplo: fibroblastos do *hamster* da China ou linfócitos da circulação periférica do ser humano ou de outros mamíferos).

1.4.1.2. *Meios e condições de cultura*

As culturas devem ser mantidas em meios de cultura e condições de incubação adequados (tipo de recipiente, concentração de CO_2, temperatura e humidade). As linhas celulares e estirpes devem ser periodicamente controladas no que respeita à estabilidade do número modal de cromossomas e à ausência de contaminação por micoplasma, não devendo ser utilizadas se se verificar que foram contaminadas. Deve ser conhecida a duração do ciclo celular normal para as células e condições de cultura utilizadas.

1.4.1.3. *Preparação das culturas*

Linhas e estirpes de células definidas: multiplicam-se as células provenientes de culturas de arranque por incubação a 37 ºC num meio cuja densidade não permita a confluência das culturas antes da colheita.

▼B

Linfócitos: adiciona-se sangue total tratado com anticoagulante (por exemplo: heparina) ou linfóticos provenientes de indivíduos saudáveis a um meio de cultura contendo um agente mitogénico (por exemplo: fito-hemoglutinina), incubando a 37 ºC.

1.4.1.4. *Activação metabólica*

As células devem ser expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema adequado de activação metabólica. O sistema mais frequentemente utilizado consiste numa fracção pós-mitocondrial reforçada com co-factor (S9) preparada a partir de fígados de roedores tratados com agentes de indução enzimática, como por exemplo Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9) ou uma mistura de fenobarbitona e β-naftoflavona (10) (11) (12).

A fracção pós-mitocondrial é geralmente utilizada em concentrações na gama dos 1-10 % v/v no meio de ensaio final. O estado do sistema de activação metabólica pode depender da classe dos produtos químicos em estudo. Em alguns casos pode revelar-se adequado utilizar várias concentrações diferentes de fracção pós-mitocondrial.

Progressos tais como a elaboração por engenharia genética de linhas celulares que exprimam enzimas de activação específicos oferecem possibilidades de activação endógena. A escolha das linhas celulares a utilizar terá de ser cientificamente justificada (por exemplo: pela relevância do isoenzima de citocromo P450 para o metabolismo da substância em estudo).

1.4.1.5. *Substância em estudo/preparação*

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes de serem adicionadas às células. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e/ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2. **Condições de ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/veículo*

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, devendo ser compatível com a sobrevivência das células e com a actividade da mistura S9. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de solventes/veículos aquosos. Quando forem realizados ensaios de substâncias instáveis na presença de água, os solventes orgânicos utilizados devem ser anidros. A água poderá ser removida através de um filtro molecular.

1.4.2.2. *Concentrações de exposição*

A citotoxidade, a solubilidade no sistema de ensaio e as alterações do pH ou da pressão osmótica constituem alguns dos critérios a ter em conta na determinação da concentração máxima.

A citotoxidade deve ser determinada na experiência principal tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica, por recurso a um indicador adequado da integridade e do crescimento celulares, nomeadamente o grau de confluência, as contagens de células viáveis ou o índice mitótico. Poderá ser útil determinar previamente a citotoxidade e solubilidade através de uma experiência preliminar.

▼B

Devem utilizar-se pelo menos três concentrações analisáveis. No caso de substâncias que sejam citotóxicas, as concentrações utilizadas devem abranger uma gama compreendida entre a toxicidade máxima e uma toxicidade reduzida ou nula; o que significa geralmente que as concentrações devem variar num factor de 2 a √10. No momento da colheita, a concentração máxima deve determinar uma redução significativa (superior a 50 %) do grau de confluência, da contagem de células viáveis e do índice mitótico. O índice mitótico constitui uma medida indirecta dos efeitos citotóxicos/citostáticos, dependendo do tempo decorrido após a exposição. Todavia, a sua utilização é aceitável no caso de culturas em suspensão, em que os restantes métodos de determinação da toxicidade podem revelar-se fastidiosos ou impraticáveis. Os dados relativos à cinética do ciclo celular, nomeadamente o tempo médio de geração (TMG), podem ser utilizados como informação suplementar. O TMG constitui, no entanto, uma média global, que nem sempre permite identificar a existência de subpopulações com um crescimento menos rápido, podendo acontecer em alguns casos que ligeiros aumentos do TMG possam resultar em atrasos muito substanciais no que respeita ao surgimento de aberrações.

No caso de substâncias sem efeitos citotóxicos consideráveis, a concentração máxima do ensaio deve ser a mais baixa de 5 µl/ml, 5 mg/ml ou 0,01 M.

Para substâncias relativamente insolúveis que não sejam tóxicas em concentrações inferiores à concentração insolúvel, a dose máxima a utilizar deve corresponder a uma concentração acima do limite de solubilidade no meio de cultura final após o período de exposição. Em alguns casos (por exemplo: quando a toxicidade apenas ocorre em concentrações superiores à menor concentração insolúvel) é conveniente ensaiar mais de uma concentração com precipitação visível. Poderá ser útil avaliar a solubilidade no início e no fim da exposição, uma vez que a mesma se pode alterar durante a exposição no sistema de ensaio devido à presença de células, de S9, de soro, etc. A insolubilidade pode ser detectada à vista desarmada. O precipitado não deve interferir com as contagens necessárias.

1.4.2.3. *Controlos negativos e positivos*

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo), tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica. Quando for utilizada activação metabólica, o produto químico de controlo positivo deve ser o mesmo que exige a activação para dar uma resposta mutagénica.

Para os controlos positivos deve ser utilizado um agente clastogénico conhecido aos níveis de exposição esperados, de forma a obter um aumento detectável e reprodutível ao longo do tempo que permita demonstrar a sensibilidade do sistema de ensaio.

As concentrações do controlo positivo devem ser escolhidas de modo a que os seus efeitos sejam claros, devendo ser utilizadas lâminas codificadas de forma a que não sejam imediatamente identificáveis pela pessoa que procede à leitura. As substâncias de controlo positivo podem ser, por exemplo:

Condição de activação metabólica	Substância	N.º CAS	N.º EINECS
Ausência de activação metabólica exógena	metanossulfonato de metilo	66-27-3	200-625-0
	metanossulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7

▼B

Condição de activação metabólica	Substância	N.º CAS	N.º EINECS
	etil nitrosureia	759-73-9	212-072-2
	mitomicina C	50-07-7	200-008-6
	N-óxido de 4-nitroquinolina	56-57-5	200-281-1
Presença de activação metabólica exógena	benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5
	ciclofosfamida ciclofosfamida monohidrato	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Podem utilizar-se no controlo positivo outras substâncias adequadas. A possibilidade de utilização de produtos químicos de uma classe afim para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam.

Para cada colheita, devem também realizar-se controlos negativos, em que as células são expostas apenas ao solvente ou veículo e ao meio de tratamento, procedendo-se do mesmo modo que num ensaio normal. Além disso, devem igualmente ser utilizados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que já existam dados de controlo que demonstrem que o solvente escolhido não induz nenhum efeito deletério ou mutagénico.

1.4.3. **Procedimento**

1.4.3.1. *Exposição à substância em estudo*

As células em crescimento são expostas à substância em estudo na presença e na ausência de um sistema de activação metabólica. Os linfócitos devem ser expostos à substância em estudo cerca de 48 horas após o estímulo mitogénico.

1.4.3.2. Normalmente, devem ser utilizadas culturas em duplicado para cada concentração, sendo fortemente recomendada a utilização de culturas em duplicado também para os controlos negativos/solventes. Quando puder ser demonstrado, a partir dos dados de experiências anteriores, que a diferença entre as culturas duplicadas é mínima (13) (14), pode aceitar-se a utilização de uma única cultura para cada concentração.

As substâncias gasosas ou voláteis devem ser ensaiadas por métodos apropriados, por exemplo em recipientes selados (15) (16).

1.4.3.3. *Intervalo de amostragem das culturas*

No primeiro ensaio, as células são expostas à substância em estudo, na presença e na ausência de um sistema de activação metabólica, durante 3-6 horas, sendo colhidas a intervalos equivalentes a cerca de 1,5 ciclos celulares normais, a partir do início da exposição (12). Se este protocolo der resultados negativos tanto na presença como na ausência de um sistema de activação, deve ser realizada uma experiência adicional sem activação, com exposição em contínuo até à colheita, passado um tempo equivalente a 1.5 ciclos celulares normais. Certos produtos químicos podem ser detectados mais facilmente com tempos de exposição/colheita superiores a 1,5 ciclos celulares. Os resultados negativos com activação metabólica terão de ser confirmados caso a caso. Nos casos em que a confirmação dos resultados negativos não seja considerada necessária, deve ser apresentada uma justificação.

▼B

1.4.3.4. *Preparação dos cromossomas*

As culturas de célula são tratadas com Colcemid® ou colchicina, geralmente durante 1-3 horas antes da colheita. Procede-se à colheita individual das culturas e ao respectivo processamento, com vista à preparação dos cromossomas, que inclui o tratamento hipotónico das células, seguido de fixação e coloração.

1.4.3.5. *Análise*

Todas as lâminas, incluindo as provenientes dos lotes de controlo positivo e negativo, devem ser independentemente codificadas antes da análise microscópica. Uma vez que os processos de fixação dão frequentemente lugar à ruptura de uma determinada proporção das células em metafase, com perda dos cromossomas, as células contabilizadas devem apresentar, para todos os tipos de célula, um número de centrómeros igual ao número modal ± 2. Devem ser contabilizadas pelo menos 200 metafases com uma boa distribuição para cada concentração e para o controlo, com boa concordância entre os replicados, quando existam. Esse número pode ser inferior caso se observe um número elevado de aberrações.

Embora o objectivo do ensaio consista na detecção de aberrações cromossómicas estruturais, devem registar-se os casos de poliploidia e de endorreduplicação, quando ocorram.

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

A unidade experimental é a célula, pelo que se deve avaliar a percentagem de células que apresentam uma aberração cromossómica estrutural. Os diferentes tipos de aberração cromossómica estrutural devem ser enumerados e discriminados pelo seu número e frequência nas culturas experimentais e de controlo. A ocorrência de lacunas é registada em separado e incluída no relatório, mas não é geralmente contabilizada para o cálculo da frequência total das aberrações.

Durante a experiência principal para a detecção de aberrações, devem ser igualmente registadas as medições da citotoxidade realizadas em paralelo com os ensaios, para todas as culturas de controlo e para os casos de resposta negativa.

Devem ser fornecidos dados individuais para cada cultura, para além de um quadro com o resumo dos dados globais.

Não é necessário comprovar uma reacção positiva inequívoca. Os resultados ambíguos devem ser esclarecidos através de experiências adicionais, de preferência com modificação das condições experimentais. A necessidade de confirmar os resultados negativos já foi discutida no ponto 1.4.3.3. As experiências subsequentes devem contemplar a modificação dos parâmetros de estudo, por forma a alargar a gama de condições avaliadas. Os parâmetros de estudo que podem ser alterados incluem a gama e os intervalos entre as diferentes concentrações e as condições da activação metabólica.

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Existem vários critérios para determinar um resultado positivo, nomeadamente o aumento do número de células com aberrações cromossómicas relacionado com a concentração ou que seja reprodutível. Deve atender-se, antes de mais, à importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos (3) (13), embora a significância estatística não deva ser o único elemento para a determinação de uma resposta positiva.

▼B

Um aumento do número de células poliplóides pode indicar que a substância em estudo apresenta o potencial de inibir a mitose e de induzir aberrações cromossómicas numéricas. Um aumento do número de células com cromossomas endorreduplicados pode indicar que a substância em estudo apresenta o potencial de inibir a progressão do ciclo celular (17) (18).

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios supra é considerada não mutagénica para o sistema em causa.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas indica que a substância em estudo induz aberrações cromossómicas estruturais nas células somáticas de mamíferos em cultura. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz aberrações cromossómicas estruturais nas células somáticas de mamíferos em cultura.

3. APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

— justificação para a escolha do veículo,

— solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/-veículo, se conhecida.

Células:

— tipo e origem das células,

— características do cariótipo e adequação do tipo de células utilizado,

— ausência de micoplasma, quando aplicável,

— informação sobre a duração do ciclo celular,

— sexo dos dadores de sangue, sangue completo ou linfócitos, agente mitogénico utilizado,

— número de passagens, quando aplicável,

— métodos de manutenção da cultura celular, quando aplicável,

— número modal de cromossomas.

Condições de ensaio:

— identificação e concentração da substância que pára a metafase, duração da exposição da célula,

— justificação para a selecção das concentrações e do número de culturas, incluindo, por exemplo, dados sobre a citotoxicidade e sobre as limitações de solubilidade, quando disponíveis,

— concentração da substância em estudo,

▼B

— volumes adicionados do veículo e da substância em estudo,

— temperatura de incubação,

— tempo de incubação,

— duração da exposição,

— densidade celular da cultura de arranque, quando aplicável,

— tipo e composição do sistema de activação metabólica, incluindo critérios de aceitabilidade,

— controlos positivos e negativos,

— métodos de preparação das lâminas,

— critérios de contabilização das aberrações,

— número de células em metafase analisadas,

— métodos de determinação da toxicidade,

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo.

Resultados:

— sinais de toxicidade, ou seja, grau de confluência, dados relativos ao ciclo celular, contagens de células, índice mitótico,

— sinais de precipitação,

— dados sobre o pH e a pressão osmótica do meio de tratamento, caso tenham sido determinados,

— definição das aberrações observadas, incluindo as lacunas,

— número de células em que se observa uma aberração cromossómica e tipo dessas aberrações, discriminados para cada cultura exposta e de controlo,

— alterações da ploidia, quando observadas,

— relação dose-resposta, quando seja possível de determinar,

— análise estatística, quando tenha sido realizada,

— dados relativos ao controlo negativo (solvente/veículo) e positivo realizados em paralelo com o ensaio,

— dados históricos sobre o controlo negativo (solvente/veículo) e positivo, com as respectivas gamas, valores médios e desvios-padrão.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Evans, H. J., (1976) Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, p. 1-29.

(2) Ishidate, M. Jr. and Sofuni, T., (1985) The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (Eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, p. 427-432.

▼B

(3) Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, MA, Anderson, G. and Zeiger, E., (1978) Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. Environs. Molec. Mutagen 10 (suppl. 10), p. 1-175.

(4) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C., (1991) Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res, 257, p. 147-204.

(5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992) Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, p. 297-305.

(6) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E., (1975) Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, p. 347-364.

(7) Maron, D.M. and Ames, B.N., (1983) Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, p. 173-215.

(8) Natarajan, A.T., Tates, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogel, N., (1976) Cytogenetic Effects of Mutagen/-Carcinogens after Activation in a Microsomal System in Vitro, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, p. 83-90.

(9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr., (1979) Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66, p. 277-290.

(10) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C., (1992) Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, p. 175-177.

(11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T., (1976) A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds) *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, p. 85-88.

(12) Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M. Jr., Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T., (1994) Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312, p. 241-261.

(13) Richardson, C., Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. and Phillips, B., (1989) Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, p. 141-154.

(14) Soper, K.A. and Galloway, S.M., (1994) Replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. Mutation Res., 312, p. 139-149.

(15) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T., (1982) CHO/-HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, p. 91-103.

▼B

(16) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L., (1983) Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environmental Mutagenesis, 5, p. 795-801.

(17) Locke-Huhle, C., (1983) Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res., 119, p. 403-413.

(18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E., (1983) Aphidicolin--induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, p. 1362-1364.

▼B

B.11. MUTAGENICIDADE — ENSAIO *IN VIVO* DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM CÉLULAS DA MEDULA DE MAMÍFEROS

1. MÉTODO

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 475 — Ensaio de aberrações cromossómicas em células da medula de mamíferos (1977).

1.1. INTRODUÇÃO

O ensaio de aberrações cromossómicas em células da medula de mamíferos é utilizado para a detecção de aberrações cromossómicas estruturais induzidas pela substância em estudo em células da medula de animais, geralmente roedores (1) (2) (3) (4). As aberrações estruturais podem ser de dois tipos, afectando os cromossomas ou os cromatídeos. A maior parte dos mutagéneos químicos induzem aberrações cromatídicas, mas também podem ocorrer aberrações cromossómicas. Um aumento da taxa de poliploidia pode indicar que um determinado produto químico tem potencial para induzir aberrações numéricas. As mutações cromossómicas e eventos relacionados causam diversas doenças genéticas humanas, existindo provas substanciais de que as alterações que causam nos oncogenes e nos genes supressores de tumores das células somáticas estão envolvidas na indução de cancro nos seres humanos e em animais utilizados em experiências.

Os animais utilizados no presente ensaio são geralmente roedores. A medula é o tecido objectivo do ensaio, por se tratar de um tecido altamente vascularizado e que contém uma população de células com grande ritmo de duplicação e que podem ser facilmente isoladas e processadas. O presente método não se destina à aplicação noutras espécies animais ou tecidos objectivo.

O presente ensaio de aberrações cromossómicas é particularmente relevante para a avaliação dos riscos mutagénicos, uma vez que permite tomar em consideração os factores do metabolismo *in vivo* da farmacocinética e dos processos de reparação do ADN, embora estes possam variar de espécie para espécie e de tecido para tecido. Os ensaios *in vivo* são igualmente úteis para a investigação complementar de efeitos mutagénicos detectados através de ensaios *in vitro*.

Se existirem provas de que nem a substância em estudo nem nenhum dos seus metabolitos reactivos entram em contacto com o tecido objectivo, o presente ensaio não é apropriado.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

Aberração cromatídica: lesão estrutural de um cromossoma expressa na ruptura, ou na ruptura seguida de união, de cromatídeos simples.

Aberração cromossómica: lesão estrutural de um cromossoma expressa na ruptura, ou na ruptura seguida de união, de ambos os cromatídeos no mesmo local.

Endorreduplicação: processo no qual, após um período S de replicação do ADN, o núcleo não entra em mitose iniciando um novo período S. O resultado são cromossomas com 4, 8, 16, ... cromatídeos.

Lacuna: lesão acromática de extensão inferior à largura de um cromatídeo e que determine um ligeiro desalinhamento do mesmo.

Aberração numérica: alteração do número de cromossomas relativamente ao número de cromossomas característico das células utilizadas.

▼B

Poliploidia: número de cromossomas múltiplo do número haplóide (n), mas diferente do número diplóide (ou seja, 3n, 4n, etc.).

Aberração estrutural: alteração da estrutura dos cromossomas detectável por exame microscópico das células em metafase, na forma de supressão de segmentos, de alterações de partes da sequência ou da troca de segmentos num cromatídeo ou entre cromatídeos.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Os animais são expostos à substância em estudo através de um modo de exposição apropriado, sendo sacrificados passado o tempo necessário após a exposição. Antes do sacrifício, os animais são tratados com um produto fixador da metafase (por exemplo, colchicina ou Colcemid®). Seguidamente, são feitas preparações de cromossomas a partir das células de medula onde, após coloração, as células em metafase são analisadas para detecção de aberrações cromossómicas.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Preparação**

1.4.1.1. *Selecção das espécies animais*

Geralmente, são utilizados ratos, ratazanas ou hamsters chineses, embora possa ser qualquer outra espécie de mamifero apropriada. Devem ser utilizados animais adultos saudáveis jovens das raças de laboratório mais comuns. No início do estudo, a variaçao de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder ± 20 % do peso médio de cada sexo.

1.4.1.2. *Condições de acomodação e alimentação*

Devem ser aplicadas as condições gerais referidas na Introdução Geral, parte B, embora o objectivo para a humidade deva ser de 50 %-60 %.

1.4.1.3. *Preparação dos animais*

Os animais adultos saudáveis jovens são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. As gaiolas devem ser dispostas de modo a que eventuais efeitos devidos à respectiva colocação sejam minimizados. Os animais são identificados de forma inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias.

1.4.1.4. *Preparação das doses*

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes de serem adicionadas às células. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e/ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2. **Condições do ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/veículo*

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo nem produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de solventes/veículos aquosos.

▼B

1.4.2.2. *Controlos*

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo) para cada sexo. Com excepção da exposição à substância em estudo, todos os animais, incluindo os dos grupos de controlo, devem ser manuseados de forma idêntica.

Os controlos positivos devem produzir aberrações estruturais *in vivo* aos níveis a que se espera o surgimento de um aumento detectável em relação à linha de base. A dose a administrar para o controlo positivo deve ser escolhida de modo a que os seus efeitos sejam claros mas também a que as lâminas codificadas não sejam imediatamente identificadas pela pessoa que procede às leituras. É aceitável que o controlo positivo seja administrado por uma via diferente da substância em estudo e que só seja realizada uma amostra. A possibilidade de utilização de produtos químicos de uma classe relacionada para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam. As substâncias de controlo positivo podem incluir, por exemplo:

Substância	Número CAS	Número EINECS
metanossulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
etilnitrosureia	759-73-9	212-072-2
mitomicina C	50-07-7	200-008-6
ciclofosfamida ciclofosfamida monohidrato	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
trietilenomelamina	51-18-3	200-083-5

Para cada colheita devem também realizar-se controlos negativos, em que os animais são expostos apenas ao solvente ou veículo, procedendo-se do mesmo modo que num ensaio normal, a menos que existam dados históricos de controlo aceitáveis em relação à variabilidade de animal para animal e à frequência da ocorrência de células com aberrações cromossómicas. Se só estiver prevista uma amostra dos controlos negativos, a altura mais apropriada é a primeira amostra. Além disso, devem igualmente ser utilizados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que já existam dados de estudos anteriores ou publicados que mostrem que o solvente/veículo escolhido não induz nenhum efeito deletério ou mutagénico.

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. **Número e sexo dos animais**

Cada grupo de estudo e de controlo deve incluir pelo menos cinco animais analisáveis por sexo. Se no momento do estudo existirem dados disponíveis de estudos com as mesmas espécies e com utilização da mesma via de administração que demonstrem que não há qualquer diferença substancial da toxicidade entre os sexos, será suficiente testar um único sexo. Nos casos em que a exposição humana aos produtos químicos possa ser específica a cada sexo, como acontece com alguns produtos farmacêuticos, o ensaio deve ser executado com animais do sexo em causa.

1.5.2. **Programação do tratamento**

As substâncias de ensaio são preferivelmente administradas numa única exposição, podendo igualmente ser administradas numa dose dividida, ou seja, duas exposições no mesmo dia, separadas por apenas algumas horas, para facilitar a administração de grandes volumes. Qualquer outro regime de administração terá de ser cientificamente justificado.

▼B

Devem ser colhidas duas amostras separadas, após exposição durante um dia. Para os roedores, a primeira amostra deve ser colhida 1,5 ciclos celulares normais (que é normalmente de 12-18 horas) após a exposição. Dado que o tempo necessário para a absorção e metabolismo da substância em estudo, bem como o seu efeito sobre a cinética do ciclo celular, podem afectar o momento óptimo para a detecção de uma eventual aberração cromossómica, recomenda-se a recolha de uma segunda amostra 24 horas após a primeira. Se forem utilizados regimes de administração ao longo de mais de um dia, deve ser colhida uma amostra 1,5 ciclos celulares normais após a exposição final.

Antes do sacrifício, os animais são injectados intraperitonealmente com uma dose apropriada de um agente de fixação da metafase (por exemplo, Colcemid® ou colchicina). As amostras serão colhidas a intervalos regulares, correspondentes a aproximadamente 3-5 horas para os ratos e a 4-5 horas para os *hamsters* chineses, a partir desse momento. As células da medula são colhidas e analisadas para detecção de aberrações cromossómicas.

1.5.3. **Doses**

Se for realizado um estudo para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados, esse estudo deve ser executado no mesmo laboratório, utilizando as mesmas espécies, linha celular, sexo e regime de exposição a utilizar no estudo principal (5). Se a substância for tóxica, deverão ser utilizadas três doses diferentes para a primeira amostragem, abrangendo uma gama compreendida entre a toxicidade máxima e uma toxicidade reduzida ou quase nula. Na segunda amostragem só será necessário avaliar a dose máxima, que é definida como a dose que produz sinais de toxicidade tais que indiquem que a utilização de doses superiores, com o mesmo regime de administração, produzirá mortalidade. As substâncias com actividade biológica específica em doses baixas e não tóxicas (como acontece com as hormonas e agentes mitogénicos) poderão constituir uma excepção aos critérios de fixação da dose, devendo ser avaliadas caso a caso. A dose máxima pode igualmente ser definida como a dose que produz algumas indicações de toxicidade na medula (por exemplo, uma redução superior a 50 % do índice mitótico).

1.5.4. **Ensaio-limite**

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2 000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se, com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, não for previsível a existência de toxicidade genética, poderá não ser considerado necessário um estudo completo com utilização de três doses diferentes. Para os estudos de maior duração, a dose limite é de 2 000 mg/kg de peso corporal/dia para as exposições até 14 dias e de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia para as exposições de duração superior a 14 dias. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios-limite.

1.5.5. **Administração das doses**

A substância em estudo é geralmente administrada por sonda esofágica, utilizando um tubo estomacal ou cânula de intubação apropriada, ou por injecção intraperitoneal. Poderão ser aceites, mediante justificação, outras vias de administração. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez por sonda esofágica ou por injecção depende também do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes mais elevados deve ser justificada. Com excepção das substâncias que causem irritação ou que sejam corrosivas, cujos efeitos serão normalmente agravados em concentrações mais altas, a variabilidade do volume de ensaio deve ser minimizada através do ajustamento das concentrações, por forma a garantir um volume constante e independente da dose a administrar.

▼B

1.5.6. **Preparação dos cromossomas**

Imediatamente após o sacrifício, a medula é colhida, exposta a uma solução hipotónica e fixada. As células são depois esfregadas em lâminas e coradas.

1.5.7. **Análise**

O índice mitótico deve ser determinado como medição da citotoxicidade em pelos menos 1 000 células por animal para todos os animais expostos à substância em estudo (incluindo os controlos positivos) e para os animais não expostos do controlo negativo.

Devem ser analisadas pelo menos 100 células de cada animal. Este número poderá ser menor quando se verificarem taxas elevadas de aberrações. Todas as lâminas, incluindo as provenientes dos lotes de controlo positivo e negativo, devem ser independentemente codificadas antes da análise microscópica. Uma vez que os processos de fixação dão frequentemente lugar à ruptura de uma determinada proporção das células em metafase, com perda dos cromossomas, as células contabilizadas devem apresentar, para todos os tipos de célula, um número de centrómeros igual ao número modal ± 2.

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os dados respeitantes a cada animal devem ser apresentados num quadro. A unidade experimental é o animal. Para cada animal, devem ser apresentados o número de células contabilizadas, o número de aberrações por célula e a percentagem de células com aberrações cromossómicas estruturais. Os diferentes tipos de aberração cromossómica estrutural devem ser enumerados, com os respectivos números e frequências, para os grupos expostos à substância em estudo e para os grupos de controlo. A ocorrência de lacunas é registada em separado e incluída no relatório, mas não é geralmente contabilizada para o cálculo da frequência total das aberrações. Se não houver qualquer evidência de uma diferença na resposta entre os sexos, os dados de ambos os sexos poderão ser combinados para fins estatísticos.

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Existem vários critérios para determinar um resultado positivo, nomeadamente o aumento do número de células com aberrações cromossómicas relacionado com a concentração ou um claro aumento do número de células com aberrações num determinado grupo ou numa determinada amostra. Deve atender-se, antes de mais, à importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos (6), embora a significância estatística não deva ser o único elemento para a determinação de uma resposta positiva. Os resultados ambíguos devem ser esclarecidos através de estudos adicionais, de preferência com modificação das condições experimentais.

Um aumento do número de células poliplóides pode indicar que a substância em estudo apresenta o potencial de inibir a mitose e de induzir aberrações cromossómicas numéricas. Um aumento do número de células com cromossomas endorreduplicados pode indicar que a substância em estudo apresenta o potencial de inibir a progressão do ciclo celular (7) (8).

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios *supra* no presente ensaio é considerada não mutagénica.

▼B

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas indica que a substância em estudo induz aberrações cromossómicas estruturais nas células da medula das espécies testadas. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz aberrações cromossómicas estruturais nas células da medula das espécies testadas.

Deve ser discutida a probabilidade de a substância em estudo ou os seus metabolitos alcançarem o sistema circulatório geral ou especificamente o tecido objectivo (ou seja, a toxicidade sistémica).

3. **APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS**

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

— justificação para a escolha do veículo,

— solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/-veículo, se conhecida.

Animais de ensaio:

— espécie/linha celular utilizada,

— número, idade e sexo dos animais,

— origem, condições de acomodação, alimentação, etc.,

— peso de cada animal no início do ensaio, incluindo a gama de pesos, a respectiva média e o desvio-padrão para cada grupo.

Condições de ensaio:

— controlos positivos e negativos (veículo/solvente),

— resultados do estudo para definição da gama de doses, quando tenha sido realizado,

— justificação para a selecção das doses,

— preparação da substância em estudo,

— modo de administração da substância em estudo,

— justificação da via de administração escolhida,

— método para a verificação de que a substância em estudo atingiu a circulação geral ou o tecido objectivo, quando aplicável,

— conversão da concentração da substância em estudo (ppm) na alimentação/abeberação para a dose real (mg/kg peso corporal/-dia), quando aplicável,

— qualidade dos alimentos e da água,

— descrição pormenorizada dos calendários de exposição e amostragem,

— métodos de medição da toxicidade,

▼B

— substância utilizada para fixar a metafase, respectiva concentração e duração de exposição,

— métodos de preparação das lâminas,

— critérios de contabilização das aberrações,

— número de células analisadas por animal,

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo.

Resultados:

— sinais de toxicidade,

— índice mitótico,

— tipo e número de aberrações observadas em cada animal,

— número total de aberrações em cada grupo, com as respectivas médias e desvios-padrão,

— número de células aberrantes em cada grupo, com as respectivas médias e desvios-padrão,

— alterações da ploidia, quando observadas,

— relação dose-resposta, quando seja possível de determinar,

— análise estatística, quando tenha sido realizada,

— dados relativos ao controlo negativo realizado em paralelo com o ensaio,

— dados históricos sobre o controlo negativo com as respectivas gamas, valores médios e desvios-padrão,

— dados relativos ao controlo positivo realizado em paralelo com o ensaio.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Adler, I.D., (1984) Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. S. Venitt and J.M. Parry (Eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., p. 275-306.

(2) Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. and Shelby, M. (1987). Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. Mutation Res., 189, p. 157-165.

(3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. and Henderson, L., (1990) *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, p. 115-141.

(4) Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B., (1994) Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. Mutation Res., 312, p. 305-312.

(5) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, p. 313-319.

▼B

(6) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge. p. 184-232.

(7) Locke-Huhle, C., (1983) Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res. 119, p. 403-413.

(8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E., (1983) Aphidicolin--induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, p. 1362-1364.

▼B

B.12. MUTAGENICIDADE — ENSAIO *IN VIVO* DOS MICRONÚCLEOS EM ERITRÓCITOS DE MAMÍFEROS

1. MÉTODO

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 474 — Ensaio dos micronúcleos em eritrócitos de mamíferos (1997).

1.1. INTRODUÇÃO

O ensaio *in vivo* dos micronúcleos de mamíferos é utilizado para a detecção de danos induzidos pela substância em estudo nos cromossomas ou no aparelho mitótico dos eritoblastos, através da análise dos eritrócitos retirados da medula e/ou de células de sangue periférico de animais, geralmente roedores.

O objectivo do ensaio do micronúcleo é identificar substâncias que causam danos citogénicos, dando lugar à formação de micronúcleos com fragmentos de cromossoma ou com cromossomas inteiros.

Quando um eritroblasto da medula se desenvolve para dar um eritrócito policromático, o núcleo principal é expulso; qualquer micronúcleo que tenha sido formado pode «ficar para atrás» (*lagging*), no citoplasma, onde não deveria existir qualquer material nuclear. A visualização dos micronúcleos é facilitada nestas células, uma vez que não existe um núcleo principal. Um aumento de frequência de eritrócitos policromáticos, micronucleados, nos animais expostos à substância em estudo representa uma indicação de danos cromossómicos induzidos.

Para o presente ensaio utiliza-se normalmente a medula de roedores, uma vez que os eritrócitos policromáticos são produzidos nesse tecido. A medição dos eritrócitos (policromáticos) imaturos micronucleados no sangue periférico é igualmente aceitável para qualquer outra espécie em que tenha sido demonstrado que o baço não tem a capacidade de eliminar os eritrócitos micronucleados ou que apresente uma sensibilidade adequada para a detecção de agentes que causam aberrações cromossómicas estruturais ou numéricas. Os micronúcleos podem ser distinguidos por alguns critérios, que incluem a identificação da presença ou ausência de um centrómero ou de ADN centromérico nos micronúcleos. A frequência dos eritrócitos (policromáticos) imaturos micronucleados é o principal ponto final utilizado. A proporção de eritrócitos (normocromáticos) maturos com micronúcleos no sangue periférico pode igualmente ser utilizada como ponto final do ensaio quando os animais forem expostos à substância em estudo de forma contínua durante quatro semanas ou mais.

O ensaio *in vivo* do micronúcleo de mamíferos é particularmente relevante para a avaliação dos perigos mutagénicos, uma vez que permite a avaliação dos elementos metabólicos, da farmacocinética e dos processos de reparação do ADN *in vivo*, embora estes possam variar de espécie para espécie, de tecido para tecido e em termos do ponto final genético. Os ensaios *in vivo* são igualmente úteis para a investigação suplementar de um efeito mutagénico detectado *in vitro*.

Se existirem provas de que nem a substância em estudo nem nenhum dos seus metabolitos reactivos entram em contacto com o tecido objectivo, o presente ensaio não é apropriado.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

▼B

1.2. DEFINIÇÕES

Centrómero: Região(ões) de um cromossoma a que estão associadas fibras fusiformes durante a divisão celular, permitindo o movimento ordeiro dos cromossomas para os pólos da célula.

Micronúcleos: Pequenos núcleos separados e adicionais dos núcleos das células principais, produzidos durante a telefase da mitose (meiose) por fragmentos do cromossoma ou cromossomas inteiros que «ficam para trás» (*lagging*).

Eritrócito normocromático: Eritrócito maduro a que faltam ribossomas e que pode, por conseguinte, distinguir-se dos eritrócitos policromáticos imaturos por coloração selectiva dos ribossomas.

Eritrócito policromático: Eritrócito imaturo, numa fase de desenvolvimento intermediária, que ainda contém ribossomas e pode, por conseguinte, distinguir-se dos eritrócitos normocromáticos maturos por coloração selectiva dos ribossomas.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Os animais são expostos à substância em estudo por uma via apropriada. Se for utilizada a medula, os animais são sacrificados passado o tempo necessário após a exposição, a medula é extraída e são feitas preparações coradas (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Quando é utilizado o sangue periférico, o sangue é recolhido passado o tempo necessário após a exposição e são preparados esfregaços corados (4) (8) (9) (10). Nos estudos com sangue periférico, as amostras de célula devem ser colhidas tão cedo quanto possível após a última exposição à substância em estudo. As preparações são analisadas para a presença de micronúcleos.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Preparação**

1.4.1.1. *Selecção das espécies animais*

Quando se pretender utilizar preparações da medula, recomenda-se a utilização de ratos ou ratazanas, embora possa ser utilizada qualquer espécie de mamífero que seja apropriada. Quando se utilizar o sangue periférico, recomenda-se a utilização de ratos. Contudo, pode ser utilizada qualquer espécie de mamífero que seja apropriada, desde que se trate de uma espécie em que o baço não remove os eritrócitos micronucleados ou que apresente uma sensibilidade adequada para a detecção de agentes que causam aberrações cromossómicas estruturais ou numéricas. Devem ser utilizados animais saudáveis jovens de linhas de laboratório com características bem conhecidas. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder + 20 % do peso médio de cada sexo.

1.4.1.2. *Condições de acomodação e alimentação*

Devem ser aplicadas as condições gerais referidas na Introdução Geral, parte B, embora o objectivo para a humidade deva ser de 50 %-60 %.

▼B

1.4.1.3. *Preparação dos animais*

Os animais adultos saudáveis jovens são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. Os animais são identificados de forma inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias. As gaiolas devem ser dispostas de modo a que eventuais efeitos devidos à respectiva colocação sejam minimizados.

1.4.1.4. *Preparação das doses*

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes de serem administradas aos animais. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e/ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2. **Condições do ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/veículo*

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo nem produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de solventes/veículos aquosos.

1.4.2.2. *Controlos*

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo) para cada sexo. Com excepção da exposição à substância em estudo, todos os animais, incluindo os dos grupos de controlo, devem ser manuseados de forma idêntica.

Os controlos positivos devem produzir micronúcleos *in vivo* aos níveis de exposição a que se espera o surgimento de um aumento detectável em relação à linha de base. A dose de controlo positivo a administrar deve ser escolhida de modo a que os seus efeitos sejam claros mas também a que as lâminas codificadas não sejam imediatamente identificadas pela pessoa que procede às leituras. É aceitável que o controlo positivo seja administrado por uma via diferente da substância em estudo e que só seja realizada uma amostra. A possibilidade de utilização de produtos químicos de uma classe relacionada para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam. As substâncias de controlo positivo podem incluir, por exemplo:

Substância	Número CAS	Número EINECS
metanossulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
etilnitrosureia	759-73-9	212-072-2
mitomicina C	50-07-7	200-008-6
ciclofosfamida ciclofosfamida monohidrato	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
trietilenomelamina	51-18-3	200-08 3-5

▼B

Para cada colheita devem também realizar-se controlos negativos, em que os animais são expostos apenas ao solvente ou veículo, procedendo-se do mesmo modo que num ensaio normal, a menos que existam dados históricos de controlo aceitáveis em relação à variabilidade de animal para animal e à frequência da ocorrência de células com aberrações cromossómicas. Se só estiver prevista uma amostra dos controlos negativos, a altura mais apropriada é a primeira amostra. Além disso, devem igualmente ser utilizados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que já existam dados de estudos anteriores ou publicados que mostrem que o solvente/veículo escolhido não induz nenhum efeito deletério ou mutagénico.

Se for utilizado o sangue periférico, uma amostra anterior à exposição poderá servir para o controlo negativo, mas apenas nos estudos de menor duração (ou seja, 1 a 3 exposições), desde que os dados respeitantes a essa amostra estejam de acordo com o esperado em função de experiências anteriores.

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. **Número e sexo dos animais**

Cada grupo exposto e de controlo deve incluir pelo menos cinco animais analisáveis por sexo (11). Se no momento do estudo existirem dados disponíveis de estudos com as mesmas espécies e com utilização da mesma via de administração que demonstrem que não há qualquer diferença substancial da toxicidade entre os sexos, será suficiente testar um único sexo. Nos casos em que a exposição humana aos produtos químicos possa ser específica a cada sexo, como acontece com alguns produtos farmacêuticos, o ensaio deve ser executado com animais do sexo em causa.

1.5.2. **Programação do tratamento**

Não é possível recomendar qualquer programação específica para a exposição (ou seja, uma, duas ou mais exposições com intervalos de 24 horas). As amostras recolhidas durante regimes de administração prolongada são aceitáveis, desde que o estudo demonstre a existência de um efeito positivo ou, para um estudo negativo, desde que a toxicidade seja demonstrada ou que se utilize uma dose limite, com administração até ao momento da colheita. As substâncias de ensaio podem igualmente ser administradas numa dose dividida, ou seja, duas exposições no mesmo dia, separadas por apenas algumas horas, para facilitar a administração de grandes volumes.

O ensaio pode ser executado de duas formas:

a) Os animais são expostos à substância em estudo uma única vez. As amostras de medula são colhidas pelo menos duas vezes, a primeira das quais pelo menos 24 horas após a exposição, com intervalos apropriados entre as colheitas mas não ultrapassando as 48 horas após a exposição. Uma eventual colheita antes de 24 horas após a exposição terá de ser justificada. As amostras de sangue periférico são colhidas pelo menos duas vezes, a primeira das quais pelo menos 36 horas após a exposição, com intervalos apropriados entre as colheitas, mas não ultrapassando as 72 horas após a exposição. Quando for identificada uma resposta positiva numa determinada colheita, não será necessário continuar o estudo;

▼B

b) Se forem utilizadas duas ou mais exposições diárias (por exemplo, duas ou mais exposições com intervalos de 24 horas), a primeira amostra deve ser colhida 18 a 24 horas depois da exposição final no caso do sangue periférico (12).

Quando necessário, poderão ser recolhidas amostras adicionais.

1.5.3. **Doses**

Se for realizado um estudo para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados, esse estudo deve ser executado no mesmo laboratório, utilizando as mesmas espécies, linha celular, sexo e regime de exposição a utilizar no estudo principal (13). Se a substância for tóxica deverão ser utilizadas três doses diferentes para a primeira amostragem, abrangendo uma gama compreendida entre a toxicidade máxima e uma toxicidade reduzida ou quase nula. Na segunda amostragem só será necessário avaliar a dose máxima, que é definida como a dose que produz sinais de toxicidade tais que indiquem que a utilização a doses superiores, com o mesmo regime de administração, produzirá mortalidade. As substâncias com actividade biológica específica em doses baixas e não tóxicas (como acontece com as hormonas e agentes mitogénicos) poderão constituir uma excepção aos critérios de fixação da dose, devendo ser avaliadas caso a caso. A dose máxima pode igualmente ser definida como a dose que produz algumas indicações de toxicidade na medula (por exemplo, redução da proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais na medula ou no sangue periférico).

1.5.4. **Ensaio-limite**

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2 000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se, com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, não for previsível a existência de toxicidade genética, poderá não ser considerado necessário um estudo completo com utilização de três doses diferentes. Para os estudos de maior duração a dose limite é de 2 000 mg/kg de peso corporal/dia para as exposições até 14 dias e de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia para as exposições de duração superior a 14 dias. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios-limite.

1.5.5. **Administração das doses**

A substância em estudo é geralmente administrada por sonda esofágica, utilizando um tubo estomacal ou cânula de intubação apropriada, ou por injecção intraperitoneal. Poderão ser aceites, mediante justificação, outras vias de administração. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez por sonda esofágica ou por injecção depende também do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes mais elevados deve ser justificada. Com excepção das substâncias que causem irritação ou que sejam corrosivas, cujos efeitos serão normalmente agravados em concentrações mais altas, a variabilidade do volume de ensaio deve ser minimizada através do ajustamento das concentrações, por forma a garantir um volume constante e independente da dose a administrar.

▼B

1.5.6. **Preparação da medula/sangue**

As células da medula são retiradas do fémur ou da tíbia imediatamente após o sacrifício. Geralmente, as células são retiradas do fémur ou da tíbia, preparadas e coradas de acordo com métodos já definidos. O sangue periférico é retirado da veia caudal ou de outro vaso sanguíneo apropriado. As células de sangue são imediatamente sujeitas a uma coloração supravital (8) (9) (10) ou então são preparados esfregaços que depois são corados. A utilização de uma coloração específica para o ADN [por exemplo, laranja de acridina (14) ou pironina-y de milho 33 258*plus* da Hoechst (15)] pode eliminar alguns dos erros associados à utilização de uma coloração não específica para o ADN. Esta vantagem não impossibilita a utilização de colorações convencionais (por exemplo, Giemsa). Outros sistemas [por exemplo, colunas de celulose para remoção das células nucleadas (16)] podem igualmente ser utilizados, desde que se demonstre que esses sistemas funcionam de forma adequada para a preparação de micronúcleos em laboratório.

1.5.7. **Análise**

A proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais (imaturos + maduros) é determinada para cada animal através da contagem de pelo menos 200 eritrócitos no caso da medula e de 1 000 eritrócitos no caso do sangue periférico (17). Todas as lâminas, incluindo as dos controlos positivos e negativos, devem ser codificadas independentemente antes da análise microscópica. A eventual ocorrência de eritrócitos imaturos micronucleados deve ser analisada em pelo menos 2 000 eritrócitos imaturos por animal. A contagem de eritrócitos maduros micronucleados poderá ser utilizada como informação adicional. Ao analisar as lâminas, a proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais não deve ser inferior a 20 % do valor de controlo. Quando os animais forem sujeitos a uma exposição contínua durante quatro semanas ou mais, poderão ser também analisados 2 000 eritrócitos maduros por animal, para determinação da ocorrência de micronúcleos. Os sistemas automatizados de análise (tratamento de imagens e citometria de fluxo e suspensões celulares) são alternativas aceitáveis à avaliação manual, se apropriadamente justificadas e validadas.

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os dados respeitantes a cada animal devem ser apresentados num quadro. A unidade experimental é o animal. Para cada animal, devem ser verificados separadamente o número de eritrócitos imaturos, o número de eritrócitos imaturos micronucleados e a proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais. Quando os animais tiverem sido expostos à substância em estudo em contínuo durante quatro semanas ou mais, devem também ser recolhidos dados em relação aos eritrócitos maduros. Para cada animal, deve ser apresentada a proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais e, se for considerado necessário, de eritrócitos maduros micronucleados. Se não houver qualquer evidência de uma diferença na resposta entre os sexos, os dados de ambos os sexos poderão ser combinados para fins estatísticos.

▼B

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Há diversos critérios para determinar um resultado positivo, como por exemplo um aumento do número de células micronucleadas relacionado com a dose ou um claro aumento do número de células micronucleadas num determinado grupo e numa determinada amostragem. Deve ser tomada em consideração, antes de mais, a importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios poderão ser utilizados métodos estatísticos (18) (19), embora a significância estatística não deva ser o único elemento para a determinação de uma resposta positiva. Os resultados ambíguos devem ser esclarecidos através de estudos adicionais, de preferência com modificação das condições experimentais.

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios acima indicados no presente ensaio é considerada não mutagénica.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio dos micronúcleos indica que a substância em estudo induz a ocorrência dos mesmos, como resultado de danos nos cromossomas ou no sistema mitótico dos eritroblastos da espécie testada. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz a ocorrência de micronúcleos nos eritroblastos imaturos da espécie testada.

Deve ser discutida a probabilidade de a substância em estudo ou os seus metabolitos alcançarem o sistema circulatório geral ou especificamente o tecido objectivo (ou seja, a toxicidade sistémica).

3. **APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS**

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

— justificação para a escolha do veículo,

— solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/-veículo, se conhecida.

Animais de ensaio:

— espécie/linha celular utilizada,

— número, idade e sexo dos animais,

— origem, condições de acomodação, alimentação, etc.,

— peso de cada animal no início do ensaio, incluindo a gama de pesos, a respectiva média e o desvio-padrão para cada grupo.

Condições de ensaio:

— controlos positivos e negativos (veículo/solvente),

— resultados do estudo para definição da gama de doses, quando tenha sido realizado,

▼B

— justificação para a selecção das doses,

— preparação da substância em estudo,

— modo de administração da substância em estudo,

— justificação da via de administração escolhida,

— método para a verificação de que a substância em estudo atingiu a circulação geral ou o tecido objectivo, quando aplicável,

— conversão da concentração da substância em estudo (ppm) na alimentação/abeberação para a dose real (mg/kg peso corporal/-dia), quando aplicável,

— qualidade dos alimentos e da água,

— descrição pormenorizada dos calendários de exposição e amostragem,

— métodos de preparação das lâminas,

— métodos de medição da toxicidade,

— critérios de contabilização dos eritrócitos imaturos micronucleados,

— número de células analisadas por animal,

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo.

Resultados:

— sinais de toxicidade,

— proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais,

— número de eritrócitos imaturos micronucleados em cada animal,

— médias e desvios-padrão dos eritrócitos imaturos micronucleados por grupo,

— relação dose-resposta, quando seja possível de determinar,

— análise estatística e respectivo método,

— dados relativos ao controlo negativo realizado em paralelo com o ensaio e dados históricos sobre o controlo negativo,

— dados relativos ao controlo positivo realizado em paralelo com o ensaio.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Heddle, J.A., (1973) A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, Mutation Res., 18, p. 187-190.

(2) Schmid, W., (1975) The Micronucleus Test, Mutation Res., 31, p. 9-15.

(3) Heddle, J.A., Salamone, M.F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. and Newell, G.W., (1983) The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. Mutation Res., 123, p. 61-118.

(4) Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A., (1990) The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene--Tox Program, Mutation Res., 239, p. 29-80.

▼B

(5) MacGregor, J.T., Schlegel, R. Choy, W.N., and Wehr, C.M., (1983) Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice. In: «Developments in Science and Practice of Toxicology», Ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, p. 555-558.

(6) MacGregor, J.T., Heddle, J.A. Hite, M., Margolin, G.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R., and Wild, D., (1987) Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erytrocytes. Mutation Res., 189, p. 103--112.

(7) MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R., and Shelby, M.E., (1990) The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. Fund. Appl. Toxicol., 14, p. 513-522.

(8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr., (1990) The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides. Mutation Res., 245, p. 245-249.

(9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test, (1992) Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS. MMS. Mutation Res., 278, p. 83-98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS. MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), (1995) Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. Mutagenesis, 10, p. 153-159.

(11) Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blackey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B., (1994) *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. Mutation Res., 312, p. 293-304.

(12) Higashikuni, N. and Sutou, S., (1995) An optimal, generalized sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. Mutagenesis, 10, p. 313-319.

(13) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Rochold, M., (1992) Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, p. 313-319.

(14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr., (1983) An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. Mutation Res., 120, p. 241-247.

(15) MacGregor, J.T., Wehr, C.M. and Langlois, R.G., (1983) A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. Mutation Res., 120, p. 269-275.

(16) Romagna, F. and Staniforth, C.D., (1989) The automated bone marrow micronucleus test. Mutation Res., 213, p. 91-104.

(17) Gollapudi, B. and McFadden, L.G., (1995) Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. Mutation Res., 347, p. 97-99.

▼B

(18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L., (1990) *In Vivo* Cytogenetics Assay. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, p. 115-141.

(19) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K., (1989) Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, p. 184-232.

▼B

B.13./14. **MUTAGENICIDADE — ENSAIO DE MUTAÇÃO REVERSA EM BACTÉRIAS**

1. **MÉTODO**

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 471 — Ensaio de mutação reversa bacteriana (1997).

1.1. INTRODUÇÃO

O ensaio de mutação reversa bacteriana utiliza estirpes de *Salmonelas typhimurium* e *Escherichia coli* carentes em aminoácidos para detectar mutações pontuais, causadas pela substituição, adição ou supressão de um ou mais pares de bases do ADN (1) (2) (3). O princípio do presente ensaio de mutação reversa bacteriana é a detecção de mutações que invertem as mutações existentes nas estirpes de ensaio, restaurando a capacidade funcional das bactérias sintetizarem um ácido essencial. As bactérias com mutação reversa são detectadas pela sua capacidade de crescimento na ausência do aminoácido em que as estirpes de ensaio eram carentes.

As mutações pontuais causam diversas doenças genéticas humanas, existindo provas substanciais de que as mutações pontuais em oncogenes e em genes supressores de tumores nas células somáticas estão envolvidas na formação de tumores nos seres humanos e em animais experimentais. O ensaio de mutação reversa bacteriana é rápido, barato e de relativamente fácil execução. Muitas das estirpes de ensaio têm diversas características que as tornam mais sensíveis para a detecção de mutações, nomeadamente sequências de ADN identificativas dos locais de inversão, aumento da permeabilidade celular a grandes moléculas e eliminação ou aumento da ocorrência de erros nos processos de reparação do ADN. A especificidade das estirpes de ensaio pode fornecer alguma informação útil sobre os tipos de mutações induzidos pelos agentes genotóxicos. Já existe uma grande base de dados com resultados respeitantes a uma vasta gama de ensaios de mutação reversa bacteriana, tendo sido desenvolvidas metodologias com características bem conhecidas e que utilizam produtos químicos com diferentes propriedades físico-químicas, nomeadamente compostos temporários.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

Ensaio de mutação reversa com *Salmonelas typhimurium* ou *Escherichia coli*: detecta mutações em estirpes carentes num determinado aminoácido (histidina ou triptofano, respectivamente), que tem como resultado a produção de uma estirpe independente do abastecimento externo desse aminoácido.

Mutagéneos de substituição de um par de bases são os agentes que causam uma alteração das bases do ADN. No ensaio de mutação reversa essa alteração pode ocorrer no local da mutação original ou num local diferente do genoma bacteriano.

Mutagéneos por deslocação do quadro de leitura são agentes que causam a adição ou supressão de um ou mais pares de bases no ADN, modificando dessa forma o quadro de leitura do ARN.

▼B

1.3. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O ensaio de mutação reversa bacteriana utiliza células procariotas, que diferem das células de mamífero em características como a absorção, metabolismo, estrutura dos cromossomas e processos de reparação do ADN. Os ensaios conduzidos *in vitro* exigem geralmente a utilização de uma fonte exógena de activação metabólica. Os sistemas de activação metabólica *in vitro* não reproduzem inteiramente as condições *in vivo* nos mamíferos. O ensaio não fornece, por conseguinte, informação directa sobre a potência mutagénica e carcinogénica da substância nos mamíferos.

O ensaio de mutação reversa bacteriana é geralmente utilizado para a despistagem inicial da actividade genotóxica e, nomeadamente, para detectar a indução de mutações pontuais. Uma extensa base de dados demonstrou que muitos produtos químicos que dão resultados positivos no presente ensaio apresentam uma actividade mutagénica noutros ensaios. Há exemplos de agentes mutagénicos que não são detectados pelo presente ensaio, podendo as razões para essas falhas ser atribuídas à natureza específica do ponto final detectado, a diferenças na activação metabólica ou ainda a diferenças na biodisponibilidade. Por outro lado, elementos que aumentem a sensibilidade do ensaio de mutação reversa bacteriana podem conduzir à sobrestimação da actividade mutagénica.

O ensaio de mutação reversa bacteriana pode não ser apropriado para a avaliação de certas classes de produtos químicos, nomeadamente compostos altamente bactericidas (por exemplo, certos antibióticos) e produtos que se pensa (ou que se sabe) que interferem especificamente com o sistema de replicação das células de mamíferos (por exemplo, alguns inibidores da topoisomerase e alguns compostos análogos a nucleosídeos). Nesses casos, poderá ser mais apropriado utilizar ensaios de mutação em células de mamíferos.

Embora muitos dos compostos que dão resultados positivos no presente ensaio sejam carcinogéneos para os mamíferos, essa correlação não é absoluta. Com efeito, a correlação depende da classe química e, por outro lado, alguns agentes carcinogéneos não são detectados no ensaio pelo facto de o seu mecanismo ou mecanismos de actuação, não genotóxicos, não afectarem as células bacterianas.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

As suspensões bacterianas são expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólico exógeno. No método de incorporação em placas, as suspensões são misturadas num revestimento de gelose e depois vertidas na superfície duma lâmina de gelose com meio mínimo. No método com incubação prévia, a mistura de tratamento é incubada e só depois misturada com uma cobertura de gelose e preparada em placas com meio mínimo. Independentemente da técnica que tenha sido utilizada, as colónias com mutação reversa são contadas e comparadas com o número de colónias com mutação reversa espontânea em placas de controlo com solvente, após dois ou três dias de incubação.

Estão descritos diversos procedimentos para executar o ensaio de mutação reversa bacteriana. Entre os mais geralmente utilizados estão o método de incorporação em placas (1) (2) (3) (4), o método com incubação prévia (2) (3) (5) (6) (7) (8), o método em flutuação (9) (10) e o método em suspensão (11). As adaptações necessárias para os ensaios de gases ou vapores também se encontram descritas (12).

▼B

Os procedimentos descritos no presente método dizem principalmente respeito aos métodos de incorporação em placas e com incubação prévia. Qualquer dos dois é aceitável para a realização de experiências na presença e na ausência de um sistema de activação metabólica. Algumas substâncias poderão ser detectadas de forma mais eficaz utilizando o método com incubação prévia. Essas substâncias pertencem a classes químicas que incluem as nitrosaminas alifáticas de cadeia curta, os metais, os aldeídos, os corantes azóicos e compostos diazócios, os alcalóides de priolizidina, os compostos alílicos e os compostos nitro (3). Por outro lado, certas classes de mutagéneos nem sempre são detectadas quando se utilizam os procedimentos padrão, tais como o método de incorporação em placas ou o método com incubação prévia. Esses casos são considerados «especiais» e recomenda-se fortemente que sejam utilizados procedimentos alternativos para a sua detecção. Estão já identificados os seguintes casos «especiais» (e exemplos dos procedimentos que podem ser utilizados para a sua detecção): corantes azóicos e compostos diazóticos (3) (5) (6) (13), gases e compostos químicos (12) (14) (15) (16) e glicósidos (17) (18) voláteis. Qualquer desvio do procedimento padrão terá de ser cientificamente justificado.

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1. **Preparação**

1.5.1.1. *Bactérias*

Devem ser utilizadas culturas frescas de bactérias na fase final do crescimento exponencial ou no início da fase estacionária (aproximadamente 10^9 células/ml). Não devem ser utilizadas culturas em fase estacionária adiantada. É essencial que as culturas utilizadas na experiência contenham um título elevado de células viáveis, que pode ser demonstrado por dados históricos de controlo sobre as curvas de crescimento ou durante o próprio ensaio, através da determinação das células viáveis em placas.

A temperatura de incubação recomendada é de 37ºC.

Devem ser utilizadas pelo menos cinco estirpes das bactérias, entre as quais quatro estirpes de *S. typhimurium* (TA1535; TA1537 ou TA97 ou TA 97a; TA98 e TA100) para as quais foi demonstrado que são fiáveis e dão resultados reprodutíveis entre laboratórios. Essas quatro estirpes de *S. typhimurium* têm um par com as bases GC no local da inversão primária e sabe-se que não permitem detectar certos agentes mutagéneos oxidantes, de ligação cruzada nem hidrazinas. Essas substâncias podem ser detectadas utilizando as estirpes *E. coli* WP2 ou *S. typhimurium* TA102 (19) que têm um par com as bases AT no local da inversão primária. Por conseguinte, a combinação de estirpes recomendada é:

— *S. typhimurium* TA1535, e

— *S. typhimurium* TA1537 ou TA97 ou TA97a, e

— *S. typhimurium* TA98, e

— *S. typhimurium* TA 100, e

— *E. coli* WP2 uvrA, ou *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), ou *S. typhimurium* TA102.

Para a detecção de agentes mutagéneos causadores de ligações cruzadas, poderá ser preferível incluir a estirpe TA102 ou acrescentar uma estirpe capaz de reparar o ADN de *E. coli* [por exemplo, *E. coli* WP2 ou *E. coli* WP2 (pKM101)].

▼B

Devem ser utilizados os procedimentos estabelecidos para a preparação de culturas de arranque, verificação dos mercadores e armazenamento. As quantidades de aminoácidos necessários para o crescimento (histidina para as estirpes de *S. typhimurium* e triptofano para as estirpes de *E. coli*) devem ser demonstradas para cada preparação de cultura de arranque conservada. Outras características fenotípicas devem também ser verificadas, a saber: a presença ou ausência de plasmídeos de Factor-r, quando necessário [ou seja, resistência à ampicilina nas estirpes TA98, TA100 e TA97 ou TA97a, WP2 uvrA e WP2 uvrA (pKM101) e resistência à ampicilina e à tetraciclina na estirpe TA102]; presença de mutações características (ou seja, mutação rfa em *S. typhimurium,* através da sensibilização com violeta de cristal, e mutação uvrA em *E. coli* ou mutação uvrB em S. *typhimurium,* através da sensibilização com raios ultravioleta) (2) (3). As estirpes devem ainda apresentar, de forma espontânea, contagens de mutações reversas nas gamas de frequência esperadas em função dos dados históricos de controlo do laboratório e também, de preferência, da literatura.

1.5.1.2. *Meio*

Será utilizado um meio mímimo de gelose apropriado (por exemplo, contendo meio mínimo Vogel-Bonner E e glucose) e uma cobertura de gelose com histidina e biotina ou triptofano para permitir alguma divisão celular (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Activação metabólica*

As bactérias devem ser expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema adequado de activação metabólica. O sistema mais geralmente utilizado é uma fracção pós-mitocondrial reforçada com co-factor (S9) preparada a partir de fígados de roedores tratados com agentes de indução enzimática, como por exemplo Aroclor 1254 (1) (2) ou uma mistura de fenobarbitona e *β*-naftoflavona (18) (20) (21). A fracção pós-mitocondrial é geralmente utilizada em concentrações na gama de 5 % a 30 % v/v na mistura S9. A escolha e o estado do sistema de activação metabólico podem depender da classe dos produtos químicos em estudo. Em alguns casos pode revelar-se adequado utilizar várias concentrações diferentes de fracção pós-mitocondrial. Para os corantes azóicos para os compostos diazóicos, poderá ser mais indicado um sistema activação metabólica redutor (6) (13).

1.5.1.4. *Substância em estudo/preparação*

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes da exposição das bactérias. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e/ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, devendo ser compatível com a sobrevivência das células e com a actividade da mistura S9. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de solventes/veículos aquosos. Quando forem realizados ensaios de substâncias instáveis na presença de água, os solventes orgânicos utilizados devem ser anidros.

▼B

1.5.2. **Condições do ensaio**

1.5.2.1. *Estirpes (ver 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Concentração de exposição*

A citotoxidade e a solubilidade na mistura final constituem alguns dos critérios a ter em conta na determinação da maior quantidade da substância em estudo a utilizar.

Poderá ser útil determinar a toxicidade e insolubilidade através de uma experiência preliminar. A citotoxicidade pode ser detectada pela redução do número de colónias com mutação reversa, pela presença de colónias mais claras ou de menores dimensões ou pelo grau de sobrevivência das culturas expostas. A citotoxidade de uma substância pode variar na presença de sistemas de activação metabólicos. A insolubilidade deve ser avaliada em função da precipitação verificável a olho nu na mistura final nas condições reais do ensaio.

A concentração máxima de ensaio recomendada para substâncias solúveis não citotóxicas é de 5 mg/placa ou de 5 µl/placa. Para as substâncias não citotóxicas insolúveis a 5 mg/placa ou a 5 µl/placa, uma ou mais das concentrações ensaiadas devem ser insolúveis na mistura final. As substâncias de ensaio citotóxicas abaixo dos 5 mg/placa ou 5 µl/placa devem ser ensaiadas até uma concentração citotóxica. O precipitado não deve interferir com a contagem.

Numa experiência inicial devem ser utilizadas pelo menos cinco concentrações analisáveis diferentes da substância em estudo, com intervalos aproximadamente semilogarítmicos (ou seja, $\sqrt{10}$) entre as concentrações. Para a investigação da relação concentração-resposta poderão ser indicados intervalos menores. Poderá ser contemplada a possibilidade de ensaiar concentrações superiores a 5 mg/placa ou 5 µl/placa quando se pretender avaliar substâncias que contenham quantidades substanciais de impurezas potencialmente mutagénicas.

1.5.2.3. *Controlos negativos e positivos*

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente ou veículo) específicos para cada estirpe, devendo, para os controlos positivos, ser escolhidas concentrações que demonstrem o desempenho eficaz de cada ensaio.

Para os ensaios com utilização de um sistema de activação metabólica, a substância de referência para os controlos positivos deve ser seleccionada com base no tipo de estirpe de bactéria utilizada.

As seguintes substâncias são exemplos de controlos positivos apropriados para os ensaios com activação metabólica:

Substância	Número CAS	Número EINECS
9,10-dimetilantraceno	781-43-1	212-308-4
7,12-dimetilbenzo[a]antraceno	57-97-6	200-359-5
benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5
2-aminoantraceno	613-13-8	210-330-9

▼B

Substância	Número CAS	Número EINECS
ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
ciclofosfamida monohidrato	6055-19-2	

A seguinte substância é um controlo positivo apropriado para o método de activação metabólico redutor:

Substância	Número CAS	Número EINECS
vermelho do Congo	573-58-0	209-358-4

O 2-aminoantraceno não deve ser utilizado como único indicador da eficácia da mistura S9. Se essa substância for utilizada, cada lote S9 deve ser igualmente caracterizado com um agente mutagénico que exija activação metabólica por enzimas microssómicos, como por exemplo o benzo[a]pireno ou o dimetilbenzo[a]an-traceno.

As seguintes substâncias são exemplos de controlos positivos específicos apropriados para cada estirpe, adequados para os ensaios sem utilização de um sistema exógeno de activação metabólica:

Substância	Número CAS	Número EINECS	Estirpe
nitrito de sódio	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 e TA 100
2-nitrofluoreno	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoacridina	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 e TA 97A
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 e TA 97A
hidroperóxido de isopropilbenzeno	80-15-9	201-254-7	TA 102
mitomicina C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA e TA 102
N-etil-N-nitro-N--nitrosoguanidina	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2 uvrA e WP2 uvrA (pKM101)
4-nitroquinolina-l--óxido	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2 uvrA e WP2 uvrA (pKM101)
furilfuramida (AF2)	3688-53-7		estirpes com plasmídeos

Podem utilizar-se no controlo positivo outras substâncias adequadas. A possibilidade de utilização de produtos químicos de uma classe afim para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam.

Devem também realizar-se controlos negativos, consistindo apenas em solvente ou veículo e sem a substância em estudo, que serão sujeitos exactamente ao mesmo procedimento que os grupos expostos. Além disso, devem igualmente ser utilizados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que existam dados históricos de controlo que demonstrem que o solvente escolhido não induz qualquer efeito deletério ou mutagénico.

▼B

1.5.3. **Procedimento**

Para o método de incorporação em placas (1) (2) (3) (4) sem activação metabólica, utilizam-se geralmente 0,05 ml ou 0,1 ml da solução de ensaio, 0,1 ml de cultura bacteriana fresca (aproximadamente 10^8 células viáveis) e 0,5 ml de tampão estéril, que são misturados com 2,0 ml de gelose de cobertura. Para o ensaio com activação metabólica, utilizam-se geralmente 0,5 ml de mistura de activação metabólica, que contém uma quantidade adequada de fracção pós-mitocondrial (entre 5 % a 30 % v/v na mistura de activação metabólica), misturada com a gelose de cobertura (2,0 ml), as bactérias e a substância em estudo/solução de ensaio. O conteúdo de cada tubo é misturado e deitado sobre uma placa de meio mínimo de gelose. A gelose de cobertura deve solidificar antes da incubação.

No método com incubação prévia (2) (3) (5) (6), a substância em estudo/solução de ensaio é previamente incubada com a estirpe de ensaio (aproximadamente 10^8 células viáveis) e o tampão estéril ou o sistema de activação metabólica (0,5 ml), geralmente durante 20 minutos ou mais a 30-37 ºC, antes de ser misturada com a gelose de cobertura e deitada sobre uma placa com meio mínimo de gelose. Normalmente, são utilizados 0,05 ou 0,1 ml da substância em estudo/solução de ensaio, 0,1 ml de cultura bacteriana e 0,5 ml da mistura S9 ou de tampão estéril, misturados com 2,0 ml de gelose de cobertura. Os tubos devem ser arejados durante a pré-incubação, utilizando o agitador.

Para uma avaliação adequada da variação, devem ser utilizadas placas em triplicado para cada dose. A utilização de placas em duplicado é aceitável, desde que seja justificada cientificamente. A perda ocasional de uma placa não invalida necessariamente o ensaio.

As substâncias gasosas ou voláteis devem ser ensaiadas por métodos apropriados, por exemplo em recipientes selados (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Incubação**

Todas as placas de cada ensaio devem ser incubadas a 37ºC durante 48-72 horas. Após a incubação, contam-se as colónias com mutação reversa em cada placa.

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os dados devem ser apresentados sob a forma do número de colónias com mutação reversa por placa. O número de colónias com mutação reversa nas placas de controlo negativas (controlo do solvente e, se tiver sido utilizado, controlo não exposto) e positivas deve também ser apresentado. As contagens individuais das placas, o número médio de colónias com mutação reversa por placa e o respectivo desvio-padrão devem ser apresentados para a substância em estudo e para os controlos positivos e negativos (não expostos à substância em estudo e/ou solvente).

Não há nenhuma exigência concreta para a verificação de uma resposta positiva clara. Os resultados ambíguos devem ser melhor esclarecidos, de preferência com modificação das condições experimentais. Os resultados negativos têm de ser confirmados caso a caso. Nos casos em que a confirmação dos resultados negativos não seja considerada necessária, deve ser apresentada uma justificação. Para a realização de experiências adicionais, deve ser analisada a possibilidade de modificação dos parâmetros do estudo, por forma a aumentar a gama de condições avaliadas. Os parâmetros que podem eventualmente ser alterados incluem a gama de concentrações, o método de tratamento (incorporação em placas ou pré-incubação em meio líquido) e as condições de activação metabólica.

▼B

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Há diversos critérios para determinar um resultado positivo, tais como um aumento do número de colónias por placa com mutação reversa em pelo menos uma estirpe, com ou sem sistema de activação metabólico, que esteja relacionado com a concentração na gama ensaiada e/ou que seja reprodutível numa ou mais das concentrações ensaiadas (23). Deve ser tomada em consideração, antes de mais, a importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos (24). Contudo, a significância estatística não deve ser o único elemento de determinação para uma resposta positiva.

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios acima indicados no presente ensaio é considerada não mutagénica.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio de mutação reversa bacteriana indica que a substância induz mutações pontuais por substituição das bases ou por deslocação do quadro de leitura no genoma de *Salmonadas typhimurium* e/ou *Escherichia coli.* Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância não é mutagénica para as espécies ensaiadas.

3. **APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS**

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

— justificação para a escolha do solvente/veículo,

— solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/-veículo, se conhecida.

Estirpes:

— estirpes usadas,

— número de células por cultura,

— características da estirpe.

Condições de ensaio:

— quantidade da substância em estudo por placa (mg/placa ou µl/-placa), com justificação da escolha da dose e do número de placas preparadas por concentração,

— meios utilizados,

— tipo e composição do sistema de activação metabólica, incluindo critérios de aceitabilidade,

— protocolo do tratamento.

Resultados:

— sinais de toxicidade,

— sinais de precipitação,

— contagens individuais das placas,

▼B

— número médio de colónias com mutação reversa por placa e respectivo desvio-padrão,

— relação dose-resposta, quando seja possível de determinar,

— análise estatística, quando tenha sido realizada,

— dados relativos aos controlos negativo (solvente/veículo) e positivo realizados em paralelo com o ensaio, com as respectivas gamas, valores médios e desvios-padrão,

— dados históricos relativos aos controlos negativo (solvente/-veículo) e positivo realizados em paralelo com o ensaio, com as respectivas gamas, valores médios e desvios-padrão.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E., (1975) Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, p. 347-364.

(2) Maron, D.M. and Ames, B.N., (1983) Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, p. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E., (1994) Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. Mutation Res., 312, p. 217-233.

(4) Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V., (1986) The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 168, p. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y., (1975) Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters, 1, p. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M., (1980) Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. p. 273-285.

(7) Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R., (1980) Bacterial Mutation Assays. In: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, p. 13-61.

(8) Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L., (1987) Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. J. Food Safety, 8, p. 167-177.

(9) Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A., (1976) Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. Mutation Res., 38, p. 33-42.

(10) Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and J.W. Bridges (1984) The Fluctuation Test in Bacteria. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam--New York-Oxford, p. 141-161.

▼B

(11) Thompson, E.D. and Melampy, P.J., (1981) An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*. Environmental Mutagenesis, 3, p. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994) Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. Mutation Res., 307, p. 335-344.

(13) Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughn, V.L., (1984) Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. Mutation Res., 136, p. 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson, B.E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K., (1992) Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. Environ. Mol. Mutagen., 19, p. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G., (1977) Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, p. 249-258.

(16) Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D., (1987) Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/-Salmonella Assay. Environmental Mutagenesis, 9, p. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T., (1979) Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*. Cancer Res., 39, p. 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B.N., (1980) Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, p. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G., (1990) Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains. Mutagenesis, 5, p. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T., (1976) A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In: «*In vitro* metabolic Activation in Mutagenesis Testing» Eds. F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, p. 85-88.

(21) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C., (1992) Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, p. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N., (1981) Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. Mutation Res., 88, p. 343-350.

(23) Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E., (1987) Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. Mutation Res. 189, p. 83-91.

▼B

(24) Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J., (1989) Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, p. 28-65.

▼B

B.15. **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 ausência 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 de um veículo apropriado. Quando se tratar 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.

▼B

Activação metabólica

As células deverão ser expostas às substâncias a testar na presença e na ausência de um 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 co-factores. 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 185-14C 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 28-30 ºC 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.

▼B

Número de placas

Deverão utilizar-se pelo menos três 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 1-5 × 10 células/ml durante um período até 18 horas, à temperatura de 28-37 ºC, 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.

▼B

B.16. **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 de uma 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 JD1 (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 conversão 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 co-factores. Podem também utilizar-se outras espécies, tecidos, fracções pós-mitocondriais ou métodos para activação metabólica.

▼B

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 28-30 ºC, 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 ºC 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 situem dentro da gama admitida normalmente.

▼B

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. As experiências iniciais deveriam ser efectuadas com células em crescimento. São expostas 1-5 × 10^7 células/ml à substância a testar durante um período até 18 horas, à temperatura de 28-37 ºC, 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/resposta se possível; avaliação estatística dos resultados,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

▼B

3.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução Geral, parte B.

▼B

B.17. MUTAGENICIDADE — ENSAIO DE MUTAÇÃO GÉNICA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS *IN VITRO*

1. MÉTODO

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 476 — Ensaio de mutação génica de mamíferos *in vitro* (1997).

1.1. INTRODUÇÃO

O ensaio de mutação génica em células de mamíferos *in vitro* pode ser utilizado para detectar mutações génicas induzidas por substâncias químicas. As linhas celulares que podem ser utilizadas incluem as células L5178Y do linfoma do rato, as linhas celulares CHO, CHO-AS52 e V79 do *hamster* chinês e as células linfoblastóides humanas TK6 (1). Nessas linhas celulares, os pontos finais genéticos mais utilizados são as mutações da timidina quinase (TK), da hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HPRT) e do transgene de xan-tina-guanina fosforibosil transferase (XPRT). Os ensaios de mutação TK, HPRT e XPRT detectam diferentes gamas de ocorrências genéticas. A localização autossómica das mutações TK e XPRT pode permitir a detecção de ocorrências genéticas (por exemplo, supressão de grandes sequências) que não são detectadas no *locus* HPRT nos cromossomas X (2) (3) (4) (6).

No ensaio de mutação génica em células de mamíferos *in vitro* podem ser utilizadas culturas de qualquer linha celular ou estirpe de características bem conhecidas. As células utilizadas são seleccionadas com base na sua capacidade de desenvolvimento em cultura e na estabilidade da frequência das mutações espontâneas.

Os ensaios realizados *in vitro* exigem geralmente a utilização de uma fonte exógena de activação metabólica. Os sistemas de activação metabólicos *in vitro* não reproduzem inteiramente as condições *in vivo* nos mamíferos. Devem portanto ser evitadas condições que conduzam a resultados que não reflectem uma mutagenicidade intrínseca. Os eventuais resultados positivos não resultantes de mutagenicidade intrínseca podem ser causados por alterações do pH, da pressão osmótica ou por níveis elevados de citotoxicidade (7).

O presente ensaio é utilizado para o controlo de eventuais agentes mutagéneos e carcinogéneos em mamíferos. Embora muitos dos compostos que dão resultados positivos no presente ensaio sejam carcinogéneos para os mamíferos, essa correlação não é absoluta. Com efeito, a correlação depende da classe química e, por outro lado, há cada vez mais dados que provam que alguns agentes carcinogéneos não são detectados no ensaio porque parecem actuar através de mecanismos não genotóxicos ou através de mecanismos ausentes nas células bacterianas (6).

Ver também a parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

Mutação para diante: mutação genética do tipo parental para a forma mutante que causa uma alteração ou perda de actividade enzimática da função da proteína codificada.

Mutagéneos por substituição de um par de bases: substâncias que causam a substituição de um ou vários pares de bases do ADN.

Mutagéneos por deslocação do quadro de leitura: substâncias que causam a adição ou supressão de um par de bases ou de uma sequência de pares de bases do ADN.

▼B

Período de expressão fenotípica: período que decorre até que os produtos dos genes inalterados se esgotem nas células recentemente sujeitas a uma mutação.

Frequência de mutação: relação entre o número de células mutantes observadas e o número de células viáveis.

Crescimento total relativo: aumento no número de células por unidade de tempo, por comparação com uma população de controlo: calculado como o produto da relação entre o crescimento em suspensão e no controlo negativo com a relação entre a eficiência de clonagem em suspensão e no controlo negativo.

Crescimento relativo em suspensão: relação entre o aumento no número de células durante o período de expressão em suspensão e no controlo negativo.

Viabilidade: eficiência de clonagem das células expostas incubadas em placas, após o período de expressão, sob condições selectivas.

Sobrevivência: eficiência de clonagem das células expostas incubadas em placas no fim do período de exposição; a sobrevivência é geralmente expressa em relação à sobrevivência da população celular de controlo.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

As células deficientes em timidina quinase (TK) devido à mutação TK± → TK± são resistentes aos efeitos citotóxicos do análogo de pirimidina da trifluorotimidina (TFT). As células que dispõem de timidina quinase são sensíveis ao TFT, que causa inibição do metabolismo celular e impede a divisão da célula. Logo, as células mutantes podem proliferar na presença de TFT, o que não acontece com as células normais, com timidina quinase. Da mesma forma, as células carentes em HPRT ou XPRT são seleccionadas pela resistência à 6-tioguanina (TG) ou à 8-azaguanina (AG). As propriedades da substância em estudo devem ser cuidadosamente tomadas em consideração se o ensaio de mutação génica em células de mamíferos for utilizado para ensaiar uma substância análoga das bases ou um composto relacionado com o agente selectivo. Assim, por exemplo, deve ser investigada qualquer suspeita de toxicidade selectiva da substância em estudo para as células mutantes e não mutantes. Logo, o desempenho do sistema/agente selectivo deve ser confirmado quando se ensaiarem produtos químicos estruturalmente relacionados com o agente selectivo (8).

As células em suspensão ou em cultura em monocamada são expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica durante um período de tempo apropriado, sendo depois cultivadas para determinar a citotoxidade e para permitir a expressão fenotípica antes de seleccionar o mutante (9) (10) (11) (12) (13). A citotoxidade é geralmente determinada através da medição da eficiência relativa de clonagem (sobrevivência) ou do crescimento total relativo das culturas após o período de exposição. As culturas expostas são mantidas em meio de crescimento durante um período de tempo suficiente, que varia em função do *locus* seleccionado e do tipo de célula, por forma a permitir uma expressão fenotípica tão boa quanto possível das mutações induzidas. A frequência de mutação é determinada inoculando um número conhecido de células num meio com agente selectivo para as células mutantes e num meio sem agente selectivo, para determinação das respectivas eficiências de clonagem (viabilidade). Após um período de incubação apropriado, as colónias são contadas. A frequência de mutação é calculada a partir do número de colónias mutantes no meio selectivo e do número de colónias no meio não selectivo.

▼B

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Preparação**

1.4.1.1. *Células*

O presente ensaio pode ser realizado com diversos tipos de células, nomeadamente subclones das células L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 ou TK6. Os tipos de célula utilizados no presente ensaio devem ter uma sensibilidade demonstrada a mutagéneos químicos, uma eficiência de clonagem elevada e uma frequência de mutação espontânea estável. As células devem ser verificadas para detectar eventuais contaminações por microplasma, não devendo ser utilizadas se estiverem contaminadas.

O ensaio deve ser concebido para ter uma determinada sensibilidade e definição. O número de células e de culturas e as concentrações da substância em estudo a utilizar serão reflexo dos parâmetros definidos (14). O número mínimo de células viáveis que devem sobreviver à exposição e ser utilizadas em cada fase do ensaio deve basear-se na frequência da mutação espontânea. A título indicativo, deve ser utilizado um número de células pelo menos dez vezes superior ao inverso da frequência de mutação espontânea, com um mínimo recomendado de 10^6 células. Para verificação da consistência do desempenho do ensaio, devem estar disponíveis dados históricos adequados sobre o sistema celular utilizado.

1.4.1.2. *Meios e condições de cultura*

Devem ser utilizados meios de cultura e condições de incubação (recipientes, temperatura, CO_2, concentração e humidade) apropriados. Os meios devem ser escolhidos de acordo com o sistema selectivo e com o tipo de células utilizados no ensaio. É particularmente importante que sejam escolhidas condições de cultura que garantam o crescimento óptimo das células durante o período de expressão e a capacidade de formação de colónia por parte das células mutantes e não mutantes.

1.4.1.3. *Preparação das culturas*

As células são propagadas a partir de culturas de arranque, inoculadas no meio de cultura e incubadas a 37 ºC. Antes da realização no presente ensaio, as culturas poderão ter de ser limpas de células mutantes eventualmente presentes.

1.4.1.4. *Activação metabólica*

As bactérias devem ser expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema adequado de activação metabólica. O sistema mais geralmente utilizado é uma fracção pós-mitocondrial reforçada com co-factor (S9) preparada a partir de fígados de roedores tratados com agentes de indução enzimática, como por exemplo Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18) ou uma mistura de fenobarbitona e β-naftoflavona (19) (20).

A fracção pós-mitocondrial é geralmente utilizada em concentrações na gama de 1-10 % v/v no meio de ensaio final. A escolha e estado do sistema de activação metabólico podem depender da classe de produto químico em estudo. Em alguns casos, poderá ser apropriado utilizar mais de uma concentração de fracção pós-mitocondrial.

▼B

Alguns desenvolvimentos, nomeadamente a produção por engenharia genética de linhas celulares que expressem enzimas de activação específicas, podem ter algum potencial em termos de activação endógena. A escolha das linhas celulares utilizadas deve ser cientificamente justificada (por exemplo, pela importância da isoenzima do citocromo P450 para o metabolismo da substância em estudo).

1.4.1.5. *Substância em estudo/preparação*

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes da exposição das células. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e/ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2. **Condições de ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/veículo*

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, devendo ser compatível com a sobrevivência das células e com a actividade da mistura S9. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de solventes/veículos aquosos. Quando forem realizados ensaios de substâncias instáveis na presença de água, os solventes orgânicos utilizados devem ser anidros. A água poderá ser removida através de um filtro molecular.

1.4.2.2. *Concentrações de exposição*

A citotoxidade, a solubilidade no sistema de ensaio e as alterações do pH ou da pressão osmótica constituem alguns dos critérios a ter em conta na determinação de concentração máxima.

A citotoxidade deve ser determinada tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica na experiência principal, utilizando um indicador apropriado da integridade e crescimento das células, tal como a eficiência relativa de clonagem (sobrevivência) ou o crescimento relativo total. Poderá ser útil determinar a toxicidade e insolubilidade através de uma experiência preliminar.

Devem ser utilizadas pelo menos quatro concentrações analisáveis. Quando existir citotoxicidade, essas concentrações devem abranger uma gama de toxicidade que varie da toxicidade máxima a quase nula; o que significa geralmente que as concentrações devem variar num factor de 2 a $\sqrt{10}$. Se a concentração máxima for definida por razões de citotoxicidade, a sobrevivência relativa (eficiência relativa de clonagem) ou o crescimento relativo total devem ser da ordem dos 10 %-20 % (mas não inferiores a 10 %). Para as substâncias com citotoxidade relativamente baixa, a concentração máxima do ensaio deve ser a mais baixa de 5 mg/ml, 5 µl/ml ou 0,01 M.

▼B

Para substâncias relativamente insolúveis a dose máxima a utilizar deve ser igual ou superior ao limite de solubilidade nas condições de cultura. A insolubilidade no meio final a que as células são expostas deve ser demonstrada. Poderá ser útil avaliar a solubilidade no início e no fim do tratamento, uma vez que a mesma se pode alterar durante a exposição no sistema de ensaio devido à presença de células, de S9, de soro, etc. A insolubilidade pode ser detectada à vista desarmada. O precipitado não deve interferir com as contagens necessárias.

1.4.2.3. *Controlos negativos e positivos*

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo), tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica. Quando for utilizada activação metabólica, o produto químico de controlo positivo deve ser o mesmo que exige activação para dar uma resposta mutagénica.

As substâncias de controlo positivo podem ser, por exemplo:

Condição de activação metabólica	*Locus*	Substância	Número CAS	Número EINECS
Ausência de activação metabólica exógena	HPRT	Metanossulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
		Etil nitrosureia	759-73-9	212-072-2
	TK (colónias pequenas e grandes)	Metanossulfonato de metilo	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Metanossulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
		Etil nitrosureia	759-73-9	212-072-2
Presença de activação metabólica exógena	HPRT	3-3-Metilcolantreno	56-49-5	200-276-4
		N-Nitrosodimetilamina	62-75-9	200-549-8
		7,12-Dimetilbenzantraceno	57-97-6	200-359-5
	TK (colónias pequenas e grandes)	Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
		Ciclofosfamida monohidrato	6055-19-2	
		Benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5
		3-3-Metilcolantreno	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-n- Nitrosodimetilamina (níveis elevados de S 9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5

Podem ser utilizadas outras substâncias de referência apropriadas para o controlo positivo. Assim, se um laboratório dispuser, por exemplo, de uma base de dados históricos sobre a utilização de 5-bromo 2'-deoxiuridina (número CAS 59-14-3, número EINECS 200-415-9), essa substância de referência poderá também ser utilizada. Quando existam, deve ser analisada a possibilidade de utilizar produtos químicos de controlo positivos de classes químicas relacionadas.

▼B

Devem também realizar-se controlos negativos, consistindo apenas em solvente ou veículo e sem a substância em estudo, que serão sujeitos exactamente ao mesmo procedimento que os grupos expostos. Além disso, devem igualmente ser utilizados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que existam dados históricos de controlo que demonstrem que o solvente escolhido não induz qualquer efeito deletério ou mutagénico.

1.4.3. **Procedimento**

1.4.3.1. *Exposição à substância em estudo*

As células em proliferação devem ser expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica durante um período de tempo apropriado (três a seis horas é geralmente eficaz). O período de exposição pode ser alargado a um ou mais ciclos celulares.

Para cada concentração a ensaiar, podem ser utilizadas culturas expostas únicas ou em duplicado. Quando forem utilizadas culturas únicas, o número de concentrações deve ser aumentado, por forma a garantir um número de culturas adequado para a análise (por exemplo, pelo menos oito concentrações analisáveis). Devem também ser incluídas culturas de controlo negativas (solventes) duplicadas.

As substâncias gasosas ou voláteis devem ser ensaiadas por métodos apropriados, por exemplo em recipientes selados (21) (22).

1.4.3.2. *Medição da sobrevivência, viabilidade e frequência de mutação*

No fim do período de exposição, as células são lavadas e cultivadas para determinar a sobrevivência e para permitir a expressão fenotípica das mutações. A medição de citotoxicidade através da determinação da eficiência relativa de clonagem (sobrevivência) ou do crescimento total relativo das culturas é geralmente iniciada após o período de exposição.

Para cada *locus* há um tempo mínimo definido para permitir uma expressão fenotípica quase óptima das mutações recentemente induzidas (o HPRT e o XPRT exigem pelo menos de seis a oito dias e o TK pelo menos dois dias). As células são cultivadas em meios com presença e ausência do agente selectivo para determinação, respectivamente, do número de mutações e da eficiência de clonagem. A medição da viabilidade (utilizada para calcular a frequência de mutação) é iniciada no fim do período de expressão através de cultura em placas com meio não selectivo.

Se a substância em estudo der um resultado positivo no ensaio L5178Y $TK^{+/-}$, deve ser realizada uma medição do tamanho das colónias em pelo menos uma das culturas de ensaio (a concentração máxima com resultado positivo) e nos controlos negativos e positivos. Se a substância em estudo der um resultado negativo no ensaio L5178Y$^{+/-}$, deve ser realizada uma medição do tamanho das colónias nos controlos negativos e positivos. Nos estudos que utilizem TK6$TK^{+/-}$ a medição do tamanho das colónias poderá também ser realizada.

▼B

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os dados devem incluir a determinação de citotoxicidade e da viabilidade, para além da contagem das colónias e das frequências de mutação nas culturas expostas e nas culturas de controlo. No caso de um resultado positivo no ensaio L5178Y $TK^{+/-}$, as colónias devem ser contabilizadas utilizando o critério das colónias pequenas e grandes em pelo menos uma das concentrações da substância em estudo (a concentração máxima com resultado positivo) e nos controlos negativos e positivos. A natureza molecular e citogénica das células mutantes que formam colónias grandes e pequenas já foi investigada em pormenor (23) (24). No ensaio $TK^{+/-}$ as colónias devem ser contabilizadas utilizando os critérios do crescimento normal (colónias grandes) e do crescimento lento (colónias pequenas) (25). As células mutantes que tenham sofrido danos genéticos mais extensos apresentam tempos de duplicação maiores, pelo que formam colónias mais pequenas. Esses danos variam tipicamente da perda da totalidade dos genes a aberrações cromossómicas só visíveis por análise do cariótipo. A indução de mutações que resultam no aparecimento de colónias pequenas foi associada com produtos químicos que induzem aberrações cromossómicas graves (26). As células menos seriamente afectadas por mutações apresentam taxas de crescimento semelhantes às células parentais e formam colónias grandes.

Deve ser apresentada a sobrevivência (eficiências relativas de clonagem) ou o crescimento total relativo. A frequência de mutação deve ser expressa como a relação entre o número de células mutantes e o número de células sobreviventes.

Devem ser fornecidos dados individuais das culturas. Para além disso, todos os dados devem ser apresentados sob a forma de um quadro.

Não há nenhuma exigência concreta para a verificação de uma resposta positiva clara. Os resultados ambíguos devem ser melhor esclarecidos, de preferência com modificação das condições experimentais. Os resultados negativos têm de ser confirmados caso a caso. Nos casos em que a confirmação dos resultados negativos não seja considerada necessária, deve ser apresentada uma justificação. Para a realização de experiências adicionais, deve ser analisada a possibilidade de modificação dos parâmetros do estudo, por forma a aumentar a gama de condições avaliadas. Os parâmetros que podem eventualmente ser alterados incluem a gama de concentrações e as condições de activação metabólica.

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Há diversos critérios para determinar um resultado positivo, tais como um aumento da frequência de mutação que esteja relacionado com a concentração na gama testada e/ou que seja reprodutível. Deve ser tomada em consideração, antes de mais, a importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos. Contudo, a importância estatística não deve ser o único elemento de determinação para uma resposta positiva.

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios acima indicados no presente ensaio é considerada não mutagénica.

▼B

Embora a maioria das experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio de mutação génica em células de mamíferos *in vitro* indica que a substância induz mutações génicas nas culturas de células de mamíferos utilizadas. Uma resposta positiva à concentração que seja reprodutível é mais significativa. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância não induz mutações génicas nas culturas de células de mamífero utilizadas.

3. **APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS**

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

— justificação para a escolha do veículo,

— solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/-veículo, se conhecida.

Células:

— tipo e origem das células,

— número de culturas celulares,

— número de transferências, quando aplicável,

— métodos de manutenção da cultura celular, quando aplicável,

— ausência de micoplasma.

Condições de ensaio:

— justificação para a selecção das concentrações e do número de culturas, incluindo, por exemplo, dados sobre a citotoxicidade e sobre as limitações de solubilidade, quando disponíveis,

— composição dos meios, concentração de CO_2

— concentração da substância em estudo,

— volumes adicionados do veículo e da substância em estudo,

— temperatura de incubação,

— tempo de incubação,

— duração de tratamento,

— densidade celular durante a exposição,

— tipo e composição do sistema de activação metabólica, incluindo critérios de aceitabilidade,

— controlos positivos e negativos,

▼B

— duração do período de expressão (incluindo o número de células inoculadas e os calendários de sub-cultura e de alimentação, quando aplicável),

— agentes selectivos,

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo,

— métodos utilizados para a enumeração dos números de células mutantes e viáveis,

— definição das colónias cuja dimensão e tipo são caracterizados (incluindo os critérios para a definição de colónias «pequenas» e «grandes», conforme apropriado).

Resultados:

— sinais de toxicidade,

— sinais de precipitação,

— dados sobre o pH e a pressão osmótica durante a exposição à substância de ensaio, caso tenham sido determinados,

— dimensão das colónias, caso tenha sido medida pelo menos para os controlos positivos e negativos,

— capacidade do laboratório para a detecção de pequenas colónias mutantes no sistema L5178Y $TK^{+/-}$, quando aplicável,

— relação dose-resposta, quando seja possível de determinar,

— análise estatística, quando tenha sido realizada,

— dados relativos ao controlo negativo (solvente/veículo) e positivo realizados em paralelo com o ensaio,

— dados históricos sobre o controlo negativo (solvente/veículo) e positivo, com as gamas, valores médios e desvios-padrão,

— frequência das mutações.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (Eds.), (1987) Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(2) Chu, E.H.Y. and Malling, H.V., (1968) Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, p. 1306-1312.

(3) Liber, H.L. and Thilly, W.G., (1982) Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts. Mutation Res., 94, p. 467-485.

(4) Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L., (1989) Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagenesis, 4, p. 394-403.

▼B

(5) Aaron, C.S. and Stankowski, Jr.L.F., (1989) Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, p. 121-128.

(6) Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. and Thompson, E., (1994) Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, p. 235--239.

(7) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C., (1991) Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, p. 147-204.

(8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J.F.S., Piper, C. and Mavournin, K.H., (1983) Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 115, p. 225-251.

(9) Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and Wasson, J.S., (1988) A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/-Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene--Tox Program. Mutation Res., 196, p. 17-36.

(10) Li, A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., O'Neill, J.P., Riddle, J.C., Stankowski, L.F. Jr. and Yang, L.L., (1987) A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, p. 135-141.

(11) Liber, H.L., Yandell, D.W and Little, J.B., (1989) A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, p. 9-17.

(12) Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R. and Hsie, A.W., (1986) Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate -and ICR 191- Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, p. 133-147.

(13) Turner, N.T., Batson, A.G. and Clive, D., (1984) Procedures for the L5178Y/$TK^{+/-}$ — $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, p. 239-268.

(14) Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith, J.C., (1989) Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J., Ed., Cambridge University Press, p. 66-101.

(15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A., (1977) Induction of 6-Thioguanine--Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse--Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, p. 365-373.

(16) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E., (1975) Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, p. 347-364.

▼B

(17) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown M.M.M., (1979) Validation and Characterization of the L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutat. Res., 59, p. 61-108.

(18) Maron, D.M. and Ames, B.N., (1983) Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, p. 173-215.

(19) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C., (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, p. 175-177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T., (1976) A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), Elsevier, North-Holland, p. 85-88.

(21) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T., (1982) CHO/-HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, p. 91--103.

(22) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L., (1983) Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environmental Mutagenesis, 5, p. 795-801.

(23) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C., (1990) Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, p. 51-55.

(24) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J., (1985) Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT^{r}) Mutants of L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151, p. 161-174.

(25) Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little, J.B., (1990) Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. Mutation Res., 229, p. 89-102.

(26) Moore, M.M. and Doerr, C.L., (1990) Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK$^{+/-}$ -3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. Mutagenesis, 5, p. 609-614.

▼B

B.18. **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 de um 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.

▼B

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 a 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 ºC.

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.

▼B

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 em 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.

▼B

Todos os resultados serão confirmados por experiências independentes.

2. **RESULTADOS**

Os 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.

▼B

3.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução Geral, parte B.

▼B

B.19. **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 SCE 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 SCE 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 de um 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 SCE serão verificados por meio de um solvente de controlo,

▼B

— 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 ^{o}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 ^{o}C.

▼B

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 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 depois cultivadas na presença de BrdU durante dois ciclos de replicação. Um outro método consiste na exposição simultânea das células à substância testada e à BrdU durante dois ciclos celulares completos.

As culturas de linfócitos humanos são tratadas 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 SCE (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 SCE. 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 SCE por metafase e o número de SCE por cromossoma são dados separadamente para todas as culturas, tratadas e controlos.

Os resultados serão analisados com métodos estatísticos adequados.

▼B

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 SCE por célula e por cromossoma (resultados indicados separadamente para cada cultura),

— critério de contagem de SCE,

— 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.

▼B

B.20. 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 de um *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).

▼B

Número de animais

O teste deve ser concebido com uma sensibilidade e grau de significância preestabelecido. 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 de uma 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 por 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.

▼B

Deverão ser utilizados métodos estatísticos apropriados na avaliação dos testes de letalidade recessiva ligada ao sexo. O reagrupamento de genes letais recessivos provenientes de um 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 de um 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.

▼B

B.21. 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 1/2, 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.

▼B

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,

  — *β*-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.

▼B

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.

▼B

B.22. **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 de os 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.

▼B

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 preestabelecidos. 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 de um 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.

▼B

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,

▼B

— 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.

▼B

B.23. ENSAIO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM ESPERMATOGÓNIAS DE MAMÍFERO

1. MÉTODO

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 483 — Ensaio de aberração cromossómica em espermatogónias de mamífero (1997).

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo do ensaio *in vivo* de aberrações cromossómicas em espermatogónias de mamífero é identificar as substâncias que causam aberrações cromossómicas estruturais nas células espermatogónias de mamífero (1) (2) (3) (4) (5). As aberrações estruturais podem ser de dois tipos, cromossómicas ou cromatídicas. A maior parte dos mutagéneos químicos induzem aberrações cromatídicas, mas também podem ocorrer aberrações cromossómicas. O método não foi concebido para medir aberrações numéricas e não é normalmente utilizado com esse objectivo. As mutações cromossómicas e eventos relacionados causam diversas doenças genéticas humanas.

O presente ensaio mede eventos a nível dos cromossomas de células germinais espermatogónias e, por conseguinte, pressupõe-se que tenha um carácter de previsão da indução de mutações transmissíveis nas células germinais.

No presente ensaio utilizam-se normalmente roedores. O ensaio citogénico *in vivo* detecta aberrações cromossómicas nas mitoses das espermatogónias. O método não diz respeito a outros tipos de células.

Para detectar aberrações cromatídicas em células espermatogónias deve examinar-se a primeira divisão mitótica da célula após a exposição, antes que as eventuais lesões sejam perdidas por via de divisões celulares subsequentes. Para obtenção de informação adicional sobre as células germinais das espermatogónias expostas pode proceder-se à análise dos cromossomas durante a meiose, para detecção de aberrações cromossómicas na diacinese-metafase 1, momento em que as células expostas passam à forma de espermatócitos.

O presente ensaio *in vivo* foi concebido para investigar se os agentes mutagéneos das células somáticas também são activos para as células germinais. Além disso, o ensaio das espermatogónias é relevante para a avaliação dos riscos de mutagenicidade, na medida em que permite a consideração dos elementos do metabolismo *in vivo*, da farmacocinética e dos processos de reparação do ADN.

Nos testículos estão presentes diversas gerações de espermatogónias, com diferentes graus de sensibilidade ao tratamento químico. Logo, as aberrações detectadas representam uma resposta agregada das várias populações de células espermatogónias expostas, com predominância para as células espermatogónias mais diferenciadas, que são em maior número. Dependendo da sua posição no testículo, diferentes gerações de espermatogónias poderão ou não ser expostas à circulação geral, devido à barreira física e fisiológica constituída pelas células de Sertoli e à barreira sangue-testículo.

Se existirem provas de que nem a substância em estudo nem nenhum dos seus metabolitos reactivos entram em contacto com o tecido objectivo, o presente ensaio não é apropriado.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

▼B

1.2. DEFINIÇÕES

Aberração cromatídica: lesão estrutural de um cromossoma expressa na ruptura, ou na ruptura seguida de união, de cromatídeos simples.

Aberração cromossómica: lesão estrutural de um cromossoma expressa na ruptura, ou na ruptura seguida de união, de ambos os cromatídeos no mesmo local.

Lacuna: lesão acromática de extensão inferior à largura de um cromatídeo e que determine um ligeiro desalinhamento do mesmo.

Aberração numérica: alteração do número de cromossomas relativamente ao número de cromossomas característico das células utilizadas.

Poliploidia: número de cromossomas múltiplo do número haplóide (n), mas diferente do diplóide (ou seja, 3n, 4n e assim por diante).

Aberração estrutural: alteração da estrutura dos cromossomas detectável por exame microscópico das células em metafase sob a forma de supressão de segmentos, de alterações de partes da sequência ou da troca de segmentos num cromatídeo ou entre cromatídeos.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Os animais são expostos à substância em estudo através de um modo de exposição apropriado, sendo sacrificados passado o tempo necessário após a exposição. Antes do sacrifício os animais são tratados com um agente de fixação da metafase (por exemplo, colchicina ou Colcemid®). Seguidamente são feitas preparações de cromossomas a partir das células germinais e, após serem coradas, as células em metafase são analisadas para detecção de aberrações cromossómicas.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Preparação**

1.4.1.1. *Selecção das espécies animais*

Geralmente, são utilizados ratos ou *hamsters* chineses machos, embora possam ser utilizados machos de qualquer outra espécie de mamífero apropriada. Devem ser utilizados animais adultos saudáveis jovens das raças de laboratório mais comuns. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder ± 20 % do peso médio de cada sexo.

1.4.1.2. *Condições de acomodação e alimentação*

Devem ser aplicadas as condições gerais referidas na Introdução Geral, parte B, embora o objectivo para a humidade deva ser de 50 %-60 %.

1.4.1.3. *Preparação dos animais*

Os animais machos adultos saudáveis jovens são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. As gaiolas devem ser dispostas de modo a que eventuais efeitos devidos à respectiva colocação sejam minimizados. Os animais são identificados de forma inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias antes de se iniciar o estudo.

▼B

1.4.1.4. *Preparação das doses*

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes de serem administradas aos animais. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e/ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2. **Condições do ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/veículo*

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, não devendo produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente/veículo aquoso.

1.4.2.2. *Controlos*

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo). Com excepção da exposição à substância em estudo, todos os animais, incluindo os dos grupos de controlo, devem ser manuseados de forma idêntica.

Os controlos positivos devem produzir aberrações estruturais *in vivo* nas células espermatogónias quando administrados aos níveis de exposição a que se espera o surgimento de um aumento detectável em relação à linha de base.

A dose de controlo positiva a administrar deve ser escolhida de modo a que os seus efeitos sejam claros mas também a que as lâminas codificadas não sejam imediatamente identificadas pela pessoa que procede às leituras. É aceitável que o controlo positivo seja administrado por uma via diferente da substância em estudo e que só seja realizada uma amostra. A possibilidade de utilização de produtos químicos de uma classe relacionada para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam. As substâncias de controlo positivo podem incluir, por exemplo:

Substância	Número CAS	Número EINECS
Ciclofosfamida Ciclofosfamida monohidrato	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Ciclohexilamina	108-91-8	203-629-0
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Acrilamida monomérica	79-06-1	201-173-7
Trietilenomelamina	51-18-3	200-083-5

Para cada amostragem prevista devem ser incluídos controlos negativos expostos apenas ao solvente ou veículo, que serão sujeitos exactamente ao mesmo procedimento que os grupos expostos, a menos que existam dados históricos de controlo aceitáveis em relação à variabilidade de animal para animal e à frequência da ocorrência de células com aberrações cromossómicas. Além disso, devem ser também preparados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que existam dados de controlo históricos ou publicados que mostrem que o solvente/veículo escolhido não induz qualquer efeito deletério ou mutagénico.

▼B

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. **Número de animais**

Cada grupo exposto e de controlo deve incluir pelo menos cinco animais machos analisáveis.

1.5.2. **Programação do tratamento**

As substâncias de ensaio são preferivelmente administradas numa ou em duas doses (ou seja, numa só exposição ou em duas exposições). As substâncias poderão igualmente ser administradas numa dose dividida, ou seja, duas exposições no mesmo dia, separadas por apenas algumas horas, para facilitar a administração de grandes volumes. Qualquer outro regime de administração terá de ser cientificamente justificado.

No grupo exposto à dose mais elevada serão realizadas duas amostras após a exposição. Uma vez que a cinética celular poderá ser afectada pela substância em estudo, serão colhidas duas amostras, uma cerca de 24 horas após a exposição e outra cerca de 48 horas após a exposição. Para os restantes animais deve ser colhida uma amostra 1,5 ciclos celulares normais ou 24 horas após a exposição, a não ser nos casos em que se saiba que a utilização de outros tempos de amostragem é mais apropriada para a detecção dos efeitos (6).

Para além disso, poderão ser utilizados outros tempos de amostragem. Assim, por exemplo, no caso de produtos químicos que possam induzir *lagging* cromossómico ou efeitos independentes do factor S, poderá ser necessário fazer a amostragem mais cedo (1).

A necessidade ou não de uma repetição da exposição terá de ser avaliada caso a caso. Se o tratamento for repetido, os animais devem ser sacrificados 24 horas (1,5 ciclos celulares) após a última exposição. Quando necessário, poderão ser realizadas amostras adicionais.

Antes do sacrifício, os animais são injectados intraperitonealmente com uma dose apropriada de um agente de fixação da metafase (por exemplo, Colcemid® ou colchicina). As amostras serão colhidas a intervalos regulares a partir desse momento. Esse intervalo corresponde a aproximadamente 3-5 horas para os ratos e a 4-5 horas para os *hamsters* chineses.

1.5.3. **Doses**

Se for realizado um estudo para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados, esse estudo deve ser executado no mesmo laboratório, utilizando as mesmas espécies, linha celular e regime de exposição a utilizar no estudo principal (7). Se existir toxicidade, serão utilizadas três doses diferentes para a primeira amostragem. Essas doses devem abranger uma gama de toxicidade máxima a quase nula. Na segunda amostragem só será necessário avaliar a dose mais elevada. A dose mais elevada é definida como a dose que produz sinais de toxicidade tais que indiquem que a utilização de doses superiores, com o mesmo regime de administração, produzirá mortalidade.

▼B

As substâncias com actividade biológica específica em doses baixas e não tóxicas (como acontece com as hormonas e agentes mitogénicos) poderão constituir uma excepção aos critérios de fixação da dose, devendo ser avaliadas numa base casuística. A dose mais elevada pode igualmente ser definida como uma dose que produz algumas indicações de toxicidade nas espermatogónias (por exemplo, redução da taxa de mitose das espermatogónias na primeira e segunda metafase meióticas; essa redução não deve ser superior a 50 %).

1.5.4. **Ensaio-limite**

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2 000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se não for previsível a existência de toxicidade genética com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, poderá não ser considerado necessário um estudo completo com utilização de três doses diferentes. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios-limite.

1.5.5. **Administração das doses**

A substância em estudo é geralmente administrada por sonda esofágica, utilizando um tubo estomacal ou cânula de intubação apropriada, ou por injecção intraperitoneal. Poderão ser aceites, mediante justificação, outras vias de administração. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez por sonda esofágica ou por injecção depende também do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes mais elevados deve ser justificada. Com excepção das substâncias que causem irritação ou que sejam corrosivas, cujos efeitos serão normalmente agravados em concentrações mais altas, a variabilidade do volume de ensaio deve ser minimizada através do ajustamento das concentrações, por forma a garantir um volume constante para todas as doses a administrar.

1.5.6. **Preparação dos cromossomas**

Imediatamente após o sacrifício, devem ser preparadas suspensões celulares de um ou de ambos os testículos, que serão seguidamente expostas a uma solução hipotónica e fixadas. As células são depois esfregadas em lâminas e coradas.

1.5.7. **Análise**

Devem ser analisadas pelo menos 100 células em metafase avançada de cada animal (ou seja, um mínimo de 500 metafases por grupo). Este número poderá ser menor quando se verificarem taxas elevadas de aberrações. Todas as lâminas, incluindo as dos controlos positivos e negativos, devem ser independentemente codificadas antes da análise microscópica. Uma vez que os procedimentos de preparação das lâminas dão frequentemente lugar à ruptura de uma certa proporção das células em metafase, com perda de cromossomas, as células contabilizadas devem conter um número de centrómeros igual a $2n \pm 2$.

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os dados respeitantes a cada animal devem ser apresentados num quadro. A unidade experimental é o animal. Para cada animal devem ser verificados o número de células com aberrações cromossómicas e o número de aberrações cromossómicas por célula. Os diferentes tipos de aberração cromossómica estrutural devem ser enumerados com os respectivos números e frequências para os grupos expostos à substância em estudo e de controlo. A ocorrência de lacunas é registada em separado e incluída no relatório, mas não é geralmente contabilizada para o cálculo da frequência total das aberrações.

▼B

Se para além das mitoses também se observarem meioses, a relação entre o número de mitoses e de metafases I ou II das espermatogónias deve ser determinada num total de 100 células em divisão por animal, para medição da citotoxicidade em todos os animais expostos à substância em estudo e do controlo negativo, de forma a poder estabelecer se existem efeitos citotóxicos. Se só se observarem mitoses, o índice mitótico deve ser calculado utilizando pelo menos 1 000 células de cada animal.

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Há diversos critérios para determinar um resultado positivo, como por exemplo um aumento do número de células com aberrações cromossómicas relacionado com a dose ou um claro aumento do número de células com aberrações num determinado grupo e numa determinada amostragem. Deve ser tomada em consideração, antes de mais, a importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos (8), embora a significância estatística não deva ser o único elemento para a determinação de uma resposta positiva. Os resultados ambíguos devem ser esclarecidos através de estudos adicionais, de preferência com modificação das condições experimentais.

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios acima indicados no presente ensaio é considerada não mutagénica.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio *in vitro* para aberrações cromossómicas em espermatogónias indica que a substância em estudo induz aberrações cromossómicas estruturais nas células germinais das espécies testadas. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz aberrações cromossómicas estruturais nas células germinais das espécies testadas.

Deve ser discutida a probabilidade de a substância em estudo ou os seus metabolitos alcançarem o sistema circulatório geral ou especificamente o tecido objectivo.

3. APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

— justificação para a escolha do veículo,

— solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/-veículo, se conhecida.

Animais de ensaio:

— espécie/linha celular utilizada,

— número e idade dos animais,

— origem, condições de acomodação, alimentação, etc.,

— peso de cada animal no início do ensaio, incluindo a gama de pesos, a respectiva média e o desvio-padrão para cada grupo.

▼B

Condições de ensaio:

— resultados do estudo para definição da gama de doses, quando tenha sido realizado,

— justificação para a selecção das doses,

— justificação da via de administração escolhida,

— preparação da substância em estudo,

— modo de administração da substância em estudo,

— justificação do momento do sacrifício,

— conversão da concentração da substância em estudo (ppm) na alimentação/abeberação para a dose real (mg/kg peso corporal/-dia), quando aplicável,

— qualidade dos alimentos e da água,

— descrição pormenorizada dos calendários de tratamento e amostragem,

— métodos de medição da toxicidade,

— substância utilizada para fixar a metafase, respectiva concentração e duração da exposição,

— métodos de preparação das lâminas,

— critérios de contabilização das aberrações,

— número de células analisadas por animal,

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo.

Resultados:

— sinais de toxicidade,

— índice mitótico,

— proporção de células espermatogónias em mitose em relação às células em metafase I ou II,

— tipo e número de aberrações, discriminados para cada animal,

— número total de aberrações por grupo,

— número de células aberrantes por grupo,

— relação dose-resposta, quando seja possível de determinar,

— análise estatística, quando tenha sido realizada,

— dados relativos ao controlo negativo realizado em paralelo com o ensaio,

— dados históricos sobre o controlo negativo, com as respectivas gama, valor médio e o desvio-padrão,

— dados relativos ao controlo positivo realizado em paralelo com o ensaio,

— alterações da ploidia, quando observadas.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

▼B

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Adler, I.D., (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (Eds.) Liss, New York, p. 477-484.

(2) Adler, I.D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J.M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, p. 275-306.

(3) Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E., (1964). An Air--Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L., (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, p. 115-141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y., (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, p. 207-209.

(6) Adler, I.D., Shelby M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N., (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, p. 313-318.

(7) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M., (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, p. 313-319.

(8) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K., (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, p. 184-232.

▼B

B.24. **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.*

▼B

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 de estes 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 órgãos 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).

▼B

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.

▼B

B.25. **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 indivíduos 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.

▼B

Número de animais

O número de animais necessários depende da frequência de translocações espontâneas bem como da taxa de indução mínima 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 simultaneamente 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 afectando 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.

▼B

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 preestabelecido, senão observar-se-á uma segunda ou uma terceira ninhada 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 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 de uma 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.

▼B

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.

▼B

3.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução Geral, parte B.

▼B

B.26. **ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL SUBCRÓNICA ESTUDO DE TOXICIDADE ORAL DE DOSE REPETIDA EM ROEDORES COM A DURAÇÃO DE 90 DIAS**

1. **MÉTODO**

O presente método de ensaio da toxicidade oral subcrónica é idêntico ao método OCDE TG 408 (1998).

1.1. INTRODUÇÃO

Ao avaliarem-se as características tóxicas de uma substância química poderá proceder-se à determinação da toxicidade oral subcrónica utilizando doses repetidas depois de se ter obtido informação inicial sobre a toxicidade a partir de ensaios de toxicidade aguda ou de dose repetida com a duração de 28 dias. O estudo de 90 dias permite obter informação sobre os perigos para a saúde susceptíveis de decorrer de uma exposição repetida ao longo de um período de tempo prolongado, abrangendo a maturação e o crescimento após o desmame e prolongando-se pela vida adulta. O estudo permitirá obter informação sobre os principais efeitos tóxicos, identificar os órgãos-alvo e a possibilidade de acumulação, bem como fazer uma estimativa de um nível de exposição sem efeitos adversos observados a utilizar na selecção dos níveis de administração em estudos crónicos e na determinação de critérios de segurança para a exposição no caso de seres humanos.

O método utilizado dá um maior destaque aos terminais neurológicos e permite formar uma ideia sobre os efeitos imunológicos e ao nível da reprodução. Deve salientar-se a necessidade de efectuar uma observação clínica pormenorizada dos animais, de modo a obter-se o máximo de informação possível. Este estudo deve permitir também identificar substâncias susceptíveis de causar efeitos neurotóxicos, imunológicos ou ao nível dos órgãos de reprodução, que poderão justificar uma investigação mais aprofundada.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

Dose: quantidade de substância administrada. A dose é expressa em termos de massa (g, mg) ou em termos da massa da substância em estudo por massa unitária do animal estudado (por exemplo, mg/kg), ou em termos de concentrações dietéticas constantes (ppm).

Dosagem: termo geral que abrange a dose administrada, bem como a frequência e duração da administração.

NOAEL: abreviatura de «*no observed adverse effect level*» («dose sem efeitos adversos observados»), que consiste na dose máxima ou no nível de exposição máximo que não produz efeitos adversos detectáveis no ensaio atribuíveis ao mesmo.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância em estudo é administrada diariamente por via oral, em doses crescentes (uma dose por lote), a vários lotes de animais de ensaio, durante um período de 90 dias. No decurso deste período, os animais são examinados em pormenor, com vista à detecção de quaisquer sinais de toxicidade. Efectua-se a autópsia dos animais que morrem ou são sacrificados durante o ensaio e, no final do mesmo, procede-se ao abate dos sobreviventes e à respectiva autópsia.

▼B

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Preparação dos animais**

Devem ser utilizados animais saudáveis que tenham sido aclimatados às condições laboratoriais durante pelo menos cinco dias e não tenham sido anteriormente submetidos a procedimentos experimentais. Os animais utilizados no estudo devem ser caracterizados quanto à espécie, estirpe, proveniência, sexo, peso e/ou idade. Os animais devem ser repartidos aleatoriamente pelos grupos de ensaio e de controlo. As gaiolas devem ser dispostas de modo a reduzir ao mínimo os eventuais efeitos devidos à respectiva colocação. Deve ser atribuído a cada animal um número de identificação diferente.

1.4.2. **Preparação das doses**

A substância em estudo é administrada por intermédio de uma sonda gástrica ou através da alimentação ou da água de beber. O método de administração oral depende do objectivo do ensaio, bem como das propriedades físico-químicas da substância em estudo.

Se necessário, a substância é dissolvida ou suspensa num veículo adequado. Sempre que possível, recomenda-se que se considere primeiramente a possibilidade de se utilizar uma solução ou suspensão aquosa; em segundo lugar, uma solução ou emulsão em óleo (nomeadamente óleo de milho); e, por último, uma solução noutro veículo. No caso de se utilizar um veículo não aquoso, devem conhecer-se as respectivas características de toxicidade. Deve também determinar-se a estabilidade da substância nas condições de administração.

1.4.3. **Condições de ensaio**

1.4.3.1. *Animais a utilizar no ensaio*

Embora possa recorrer-se a outros roedores, como por exemplo o ratinho, o rato constitui a espécie preferida. Devem utilizar-se animais adultos, jovens e saudáveis, de estirpes correntes de laboratório. As fêmeas devem ser nulíparas e não grávidas. A administração da substância deve ter início logo que possível após o desmame e, em qualquer caso, antes de os animais completarem nove semanas de idade. No início do estudo, a variação de massa dos animais deve ser mínima, não excedendo ± 20 % da massa média de cada sexo. Caso o estudo preceda um estudo da toxicidade crónica a longo prazo, é conveniente utilizar em ambos os casos animais da mesma estirpe e proveniência.

1.4.3.2. *Número e sexo*

Para cada dose devem utilizar-se, pelo menos, 20 animais (10 machos e 10 fêmeas). Caso se preveja o sacrifício de alguns animais durante o ensaio, o referido número deve ser acrescido do número de animais a sacrificar. Com base em conhecimentos anteriores da substância em estudo ou de um análogo próximo, deverá considerar-se a possibilidade de incluir um lote extra de 10 animais (cinco de cada sexo) no grupo de controlo e no grupo a que irá ser administrada a dose máxima, a fim de se observar, após o período de ensaio, a reversibilidade ou persistência de eventuais efeitos tóxicos. A duração deste período de observação deverá ser correctamente estabelecida tendo em conta os efeitos a observar.

▼B

1.4.3.3. *Doses*

Devem ser utilizadas pelo menos três doses e um controlo simultâneo, excepto nos casos em que seja realizado um ensaio-limite (ver 1.4.3.4). As doses poderão basear-se nos resultados de estudos de dose repetida ou de determinação da gama, e deverão levar em conta todos os dados toxicológicos e toxicocinéticos existentes para a substância em estudo ou substâncias afins. A dose máxima deve ser seleccionada com a finalidade de provocar toxicidade, mas não a morte nem um sofrimento excessivo, a não ser que a natureza físico-química ou os efeitos biológicos da substância em estudo determinem que a referida dose seja limitada. Deve seleccionar-se uma sequência decrescente de doses, com o objectivo de evidenciar uma correlação entre a dose administrada e a reacção observada, bem como a ausência de efeitos adversos associados à administração da dose mínima (NOAEL). A diferença óptima entre as doses consiste, frequentemente, num factor de 2 a 4; em muitos casos, a utilização de um quarto lote de ensaio é preferível ao recurso a intervalos de grande amplitude (por exemplo, superior a um factor de 6-10) entre as doses.

O grupo de controlo deve ser constituído por animais aos quais não é administrada a substância em estudo ou um grupo de controlo do veículo se for utilizado um veículo para administrar a substância em estudo. Com excepção da exposição à substância em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser manuseados de forma idêntica aos outros animais. Caso se recorra a um veículo para a administração da substância em estudo, deve administrar-se o volume máximo do mesmo aos animais do lote de controlo. Se a substância em estudo for administrada através dos alimentos e causar um menor consumo alimentar, será vantajoso utilizar-se um grupo de controlo alimentado aos pares para se distinguir entre as reduções que se devem à palatabilidade e a alterações toxicológicos no modelo em estudo.

Deverão considerar-se as seguintes características do veículo e outros aditivos, conforme aplicável; efeitos ao nível da absorção, distribuição, metabolismo ou retenção da substância em estudo; efeitos nas propriedades químicas da substância em estudo susceptíveis de alterar as suas características tóxicas; e efeitos no consumo de alimentos ou água ou no estado nutricional dos animais.

1.4.3.4. *Ensaio-limite*

Sempre que um ensaio, realizado de acordo com o presente método, que utilize uma dose de pelo menos 1 000 mg/kg de massa corporal/dia, não produza efeitos tóxicos observáveis, ou se, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não se prevejam efeitos tóxicos, poderá não ser necessário efectuar um ensaio completo com três doses. Nestes casos, justifica-se a realização de um ensaio-limite, excepto se a exposição humana indicar a necessidade de recurso a uma dose superior.

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. **Administração das doses**

A substância é administrada diariamente aos animais durante um período de 90 dias; em casos devidamente justificados, pode proceder-se à administração cinco dias por semana. A administração forçada deve efectuar-se numa dose única, por intermédio de uma sonda gástrica ou de uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido que pode administrar-se de cada vez depende das dimensões do animal. Esse volume não deve exceder 1 ml/100 g de massa corporal, excepto no caso de soluções aquosas, em que se poderá utilizar um volume de 2 ml/100 g de massa corporal. Salvo no caso de substâncias corrosivas ou irritantes, cujos efeitos são, de modo geral, agravados em concentrações mais elevadas, devem minimizar-se as variações no volume mediante o ajustamento da concentração, de modo a assegurar um volume constante para todas as doses.

▼B

Caso a substância em estudo seja administrada através dos alimentos ou da água de beber, deve assegurar-se que as respectivas quantidades não perturbam o equilíbrio nutricional e hídrico normal. Se a substância for administrada com os alimentos, pode utilizar-se uma concentração alimentar constante, expressa em ppm, ou uma dose constante, expressa em relação à massa corporal dos animais; deve especificar-se a alternativa adoptada. No caso do recurso a uma sonda gástrica, a dose deve ser administrada diariamente à mesma hora e, se necessário, ajustada de modo a manter uma dose constante em relação à massa corporal do animal. Caso um ensaio de 90 dias preceda um estudo da toxicidade crónica a longo prazo, é conveniente utilizar uma dieta semelhante em ambos os ensaios.

1.5.2. **Observações**

O período de observação deve ser de, pelo menos, 90 dias. Os animais incluídos nos lotes extra destinados a observações subsequentes devem ser mantidos durante um período de tempo suficiente sem administração da substância em estudo de modo a detectar a persistência ou a recuperação dos efeitos tóxicos.

Deve efectuar-se um exame clínico pelo menos uma vez por dia, de preferência à mesma hora, em função do período previsto de efeitos mais agudos devidos à administração da substância, registando-se o estado de saúde dos animais. Todos os animais deverão ser examinados pelo menos duas vezes por dia, normalmente ao princípio e ao fim de cada dia, a fim de se identificarem sinais de morbilidade e mortalidade.

Deve proceder-se a um exame clínico aprofundado de todos os animais pelo menos uma vez antes da primeira exposição (de modo a permitir efectuar comparações para o mesmo indivíduo) e uma vez por semana após a mesma. O exame deve decorrer no exterior da gaiola, num recinto adequado e, de preferência, à mesma hora. As observações devem ser cuidadosamente registadas, de preferência por recurso a um sistema definido em pormenor pelo laboratório em causa. Deve procurar-se assegurar que as variações nas condições de observação sejam mínimas. Os sinais anotados devem incluir, nomeadamente, alterações na pele, no pêlo, nos olhos e nas mucosas, bem como a ocorrência de secreções, excreções ou actividade autónoma (como, por exemplo, lacrimação, erecção pilosa, alterações nas pupilas, respiração anormal). Devem também registar-se quaisquer alterações da atitude, postura e reacção à manipulação, além da ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e comportamentos estereotipados (por exemplo, actos de higiene repetitivos, movimentos circulares repetitivos) ou estranhos (automutilação, marcha para a retaguarda) (1).

Deve proceder-se a um exame oftalmológico, utilizando um oftalmoscópio ou equipamento equivalente adequado, antes de se iniciar a administração da substância em estudo e ao terminar o estudo, de preferência a todos os animais, ou pelo menos aos animais dos grupos de dose máxima e de controlo. Se forem detectadas alterações nos olhos, devem examinar-se todos os animais.

Na fase final do período de exposição, mas, em qualquer caso, nunca antes da 11.ª semana, deve proceder-se à avaliação da reactividade sensorial a estímulos de diferentes tipos (1) (por exemplo, estímulos auditivos, visuais e proprioceptivos) (2), (3), (4), avaliação da força de preensão (5) e avaliação da actividade motora (6). Para mais pormenores sobre os procedimentos que se podem utilizar, devem consultar-se as respectivas referências. No entanto, também se poderão adoptar procedimentos alternativos aos indicados nas referências.

As observações funcionais poderão ser omitidas na fase final do estudo quando existirem dados sobre observações funcionais de outros estudos e os exames clínicos realizados diariamente não revelarem quaisquer deficiências funcionais.

▼B

Excepcionalmente, podem omitir-se as observações funcionais no caso de lotes que apresentem sinais de toxicidade cuja intensidade seja susceptível de interferir de modo significativo com as mesmas.

1.5.2.1. *Massa corporal e consumo de alimentos/água*

Todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana. O consumo de alimentos deve ser medido pelo menos uma vez por semana. Se a substância em estudo for administrada através da água de beber, deve também medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana. O consumo de água também poderá ser levado em conta em estudos dietéticos ou de administração forçada em que esse consumo se possa alterar.

1.5.2.2. *Hematologia e bioquímica clínica*

Devem colher-se amostras de sangue de um local designado e, caso aplicável, essas amostras deverão ser armazenadas em condições adequadas. No final do período de estudo, serão colhidas amostras logo antes de se abaterem os animais ou como parte do procedimento de abate.

No final do ensaio e no caso de terem sido colhidas amostras de sangue intercalares, devem determinar-se os seguintes parâmetros hematológicos: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e medida do tempo/potencial de coagulação.

Devem também efectuar-se determinações bioquímicas destinadas a investigar os principais efeitos tóxicos sobre os tecidos, nomeadamente renal e hepático, com amostras de sangue de todos os animais, colhidas imediatamente antes do respectivo abate ou no âmbito do mesmo (com excepção dos animais encontrados moribundos ou abatidos no decurso do ensaio). Tal como no caso de estudos hematológicos, poderá efectuar-se uma recolha de amostras intercalares para efeito de análises bioquímicas clínicas. Recomenda-se que os animais sejam jejuados desde a véspera da colheita de sangue ([1]). Os parâmetros a determinar no plasma ou no soro são os seguintes: sódio, potássio, glicose, colesterol total, ureia, creatinina, proteínas totais e albumina, além de, pelo menos, dois enzimas indicadores dos efeitos hepatocelulares (tais como a alanina-aminotransferase, a aspartato-aminotransferase, a fosfatase alcalina, a gama-glutamil transpeptidase e a sorbitol-desidrogenase). A determinação de outras enzimas de origem hepática ou diversa, bem como de ácidos biliares, poderá, em determinados casos, proporcionar informações úteis.

Em opção, podem realizar-se na última semana do ensaio as seguintes determinações na urina, recolhida de acordo com um programa previamente estabelecido: aparência, volume, osmolalidade ou gravidade específica, pH, proteínas, glicose e sangue/hematócitos.

Além disso, deve prever-se a pesquisa de marcadores séricos que forneçam indicações gerais sobre a lesão de tecidos. Caso as propriedades conhecidas da substância afectem, ou se preveja que possam afectar, perfis metabólicos conexos, devem realizar-se outras determinações, nomeadamente de cálcio, fosfatos, triglicéridos em jejum, hormonas específicas, meta-hemoglobina e colinesterase. A necessidade de efectuar tais determinações é estabelecida em função do tipo de substância em estudo ou de cada caso específico.

([1]) Para a determinação de determinados parâmetros no soro e no plasma, nomeadamente a glicose, é preferível que os animais sejam jejuados desde a véspera, principalmente porque, não sendo jejuados, haverá inevitavelmente uma maior variabilidade que tenderá a encobrir os efeitos mais subtis e a tornar difícil a interpretação dos resultados. No entanto, por outro lado, o jejum desde a véspera poderá interferir no metabolismo geral dos animais, e, particularmente em estudos alimentares, poderá perturbar a exposição diária à substância em estudo. Se for adoptado o jejum desde a véspera, deverão efectuar-se determinações bioquímicas após a realização das observações funcionais do estudo.

▼B

De um modo geral, deve adoptar-se uma abordagem flexível, em função das espécies e dos efeitos observados e/ou previstos da substância em causa.

Se os dados disponíveis relativos a ensaios anteriores se revelarem inadequados, haverá que decidir sobre a necessidade de se determinarem parâmetros hematológicos e bioquímicos antes de administrar a substância. De um modo geral, não se recomenda que estes dados sejam gerados antes de se iniciar a administração (7).

1.5.2.3. *Autópsia geral*

Todos os animais devem ser objecto de uma autópsia geral pormenorizada que inclua o exame da superfície exterior do corpo, dos orifícios e das cavidades craniana, torácica e abdominal, bem como do respectivo conteúdo. Devem remover-se de modo adequado as membranas aderentes a órgãos tais como o fígado, os rins, as glândulas supra-renais, os testículos, os epidídimos, o timo, o baço, o cérebro e o coração, cuja massa húmida deve ser determinada logo que possível após a dissecação, de modo a evitar a respectiva dessecação. Este procedimento aplica-se a todos os animais (excepto os que estiverem moribundos ou tiverem sido abatidos no decurso do ensaio).

Os órgãos e tecidos que se seguem devem ser conservados num meio de fixação adequado aos mesmos, bem como ao tipo de exame histopatológico subsequente: todos os tecidos que apresentem lesões evidentes, encéfalo (regiões representativas, nomeadamente cérebro, cerebelo e protuberância), espinal medula (a três níveis: cervical, médio-torácico e lombar), pituitária, tiróide, paratiróide, timo, esófago, glândulas salivares, estômago, intestino delgado e cólon (incluindo as placas de Peyer), fígado, rins, glândulas supra-renais, baço, coração, traqueia e pulmões (conservados por insuflação com fixador seguida de imersão), aorta, gónadas, útero, órgãos genitais acessórios, glândula mamária (nas fêmeas), próstata, bexiga, vesícula (ratinho), gânglios linfáticos (de preferência um gânglio situado na via de administração e um gânglio distante da mesma, de modo a investigar possíveis efeitos sistémicos), nervos periféricos (ciático ou tibial), de preferência na proximidade de músculos, e uma secção de medula óssea (ou, como alternativa, um aspirado de medula óssea recentemente montado), pele e olhos (se tiverem sido observadas alterações no exame oftalmológico). Em função das observações clínicas ou de natureza diversa efectuadas, poderá ser necessário examinar outros tecidos. Devem também conservar-se quaisquer órgãos susceptíveis de constituírem alvos da substância em estudo, em virtude das propriedades conhecidas da mesma.

1.5.2.4. *Histopatologia*

Deve proceder-se ao exame histopatológico dos órgãos e tecidos conservados dos animais dos grupos de controlo, bem como dos lotes sujeitos a doses elevadas. Caso o exame destes últimos revele alterações atribuíveis à substância em estudo, devem examinar-se também os animais de todos os lotes restantes.

Devem examinar-se todas as lesões importantes.

Sempre que se recorra a um lote extra, deve proceder-se ao exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos restantes lotes.

▼B

2. **RESULTADOS E SUA APRESENTAÇÃO**

2.1. DADOS

Devem registar-se os dados relativos a cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, referindo-se, para cada lote de ensaio, o número de animais no início do ensaio, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou abatidos por uma questão de humanidade, a hora da morte de cada animal, o número de animais que apresentam sinais de toxicidade, a descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o tempo decorrido até à respectiva manifestação, bem como a sua duração e gravidade, o número de animais que apresentem lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais que apresentam cada tipo de lesões.

Caso aplicável, os resultados numéricos devem ser avaliados segundo um método estatístico adequado e geralmente aceite. Os métodos estatísticos e dados a serem analisados devem ser seleccionados durante a fase de concepção do estudo.

2.2. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

2.2.1. **Substância em estudo:**

— natureza física, pureza e propriedades físico-químicas,

— dados de identificação,

— veículo (caso aplicável): justificação da escolha de um veículo não aquoso.

2.2.2. **Espécie submetida ao ensaio:**

— espécie e estirpe utilizada,

— número, idade e sexo dos animais,

— origem, condições de acomodação, alimentação, etc.,

— massa de cada animal no início do ensaio.

2.2.3. **Condições do ensaio:**

— justificação das doses seleccionadas,

— pormenores relativos à preparação da substância em estudo e à sua eventual incorporação nos alimentos, nomeadamente a respectiva concentração, estabilidade e homogeneidade,

— modo de administração da substância em estudo,

— doses reais (mg/kg massa corporal/dia), e factor de conversão da concentração da substância em estudo na alimentação/abeberação (ppm) para a dose real, quando aplicável,

— pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água.

2.2.4. **Resultados:**

— massa corporal e respectivas alterações,

— consumo de alimentos e de água, se for caso disso,

— reacções tóxicas em função do sexo e da dose administrada, nomeadamente sinais de toxicidade,

▼B

— natureza, gravidade e duração dos sinais clínicos (reversíveis ou não),

— resultados do exame oftalmológico,

— dados relativos à actividade sensorial, força de preensão e actividade motora (caso existam),

— resultados da análise hematológica, acompanhados dos respectivos parâmetros de base,

— resultados da análise bioquímica, acompanhados dos respectivos parâmetros de base,

— massa corporal final, massa dos órgãos e relações massas dos órgãos/massa corporal,

— dados obtidos por autópsia,

— descrição pormenorizada dos resultados do exame histopatológico,

— dados de absorção, caso se encontrem disponíveis,

— tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) IPCS, (1986) Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

(2) Tupper, D.E., Wallace, R.B., (1980) Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, p. 999-1003.

(3) Gad, S.C., (1982) A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9, p. 691-704.

(4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M., (1991) Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, p. 267-283.

(5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T., (1979) A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind-limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, p. 233-236.

(6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C., (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, p. 599-609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, Fundam. & Appl. Toxicol, 29, pp. 198-201.

▼B

B.27. **ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL SUBCRÓNICA ESTUDO DE TOXICIDADE ORAL DE DOSE REPETIDA EM ESPÉCIES NÃO ROEDORAS COM A DURAÇÃO DE 90 DIAS**

1. **MÉTODO**

O presente método de ensaio da toxicidade oral subcrónica é idêntico ao método OCDE TG 409 (1998).

1.1. INTRODUÇÃO

Ao avaliarem-se as características tóxicas de uma substância, poderá proceder-se à determinação da toxicidade oral subcrónica utilizando doses repetidas depois de se ter obtido informação inicial sobre a toxicidade em ensaios de toxicidade aguda ou de dose repetida com a duração de 28 dias. O estudo de 90 dias permite obter informação sobre os perigos para a saúde susceptíveis de decorrer de uma exposição repetida ao longo de um período de crescimento rápido e até ao início da vida adulta. O estudo permitirá obter informação sobre os principais efeitos tóxicos, identificar os órgãos-alvo e a possibilidade de acumulação, bem como fazer uma estimativa de um nível de exposição sem efeitos adversos observados a utilizar na selecção dos níveis de administração em estudos crónicos e na determinação de critérios de segurança para a exposição no caso de seres humanos.

O método de ensaio permite identificar, em espécies não roedoras, os efeitos adversos da exposição a substâncias químicas e deve ser utilizado apenas:

— nos casos em que os efeitos observados noutros estudos revelem a necessidade de clarificação/caracterização numa segunda espécie não roedora, ou

— nos casos em que estudos toxicocinéticos revelem que uma determinada espécie não roedora é a escolha de animal laboratorial mais adequada, ou

— nos casos em que outras razões específicas justifiquem a utilização de uma espécie não roedora.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

Dose: quantidade de substância administrada. A dose é expressa em termos de massa (g, mg) ou em termos da massa da substância de ensaio por massa unitária do animal estudado (por exemplo, mg/kg), ou em termos de concentrações dietéticas constantes (ppm).

Dosagem: termo geral que abrange a dose administrada, bem como a frequência e duração da administração.

NOAEL: abreviatura de «no *observed adverse effect level*» («dose sem efeitos adversos observados»), que consiste na dose máxima ou no nível de exposição máximo que não produz efeitos adversos detectáveis no ensaio atribuíveis ao mesmo.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância em estudo é administrada diariamente por via oral, em doses crescentes (uma dose por lote), a vários lotes de animais de ensaio, durante um período de 90 dias. No decurso deste período os animais são examinados em pormenor, com vista à detecção de quaisquer sinais de toxicidade. Efectua-se a autópsia dos animais que morrem ou são sacrificados durante o ensaio e, no final do mesmo, procede-se ao abate dos sobreviventes e à respectiva autópsia.

▼B

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Selecção das espécies animais**

A espécie não roedora normalmente utilizada é o cão, que deve ser de uma raça específica: utiliza-se frequentemente o *beagle*. Poderão também utilizar-se outras espécies, como, por exemplo, suínos ou mini-suínos. Não se recomendam primatas, cuja utilização deve ser justificada. Devem utilizar-se animais jovens e saudáveis, e, no caso do cão, a administração deve iniciar-se de preferência aos 4-6 meses, o mais tardar aos 9 meses de idade. No caso de o estudo preceder um estudo da toxicidade crónica a longo prazo, deve utilizar-se a mesma espécie/raça em ambos os casos.

1.4.2. **Preparação dos animais**

Devem ser utilizados animais saudáveis que tenham sido aclimatados às condições laboratoriais e não tenham sido anteriormente submetidos a processos experimentais. A duração da aclimatação dependerá da espécie seleccionada para o ensaio e da sua proveniência. Recomenda-se uma aclimatação de pelo menos cinco dias para os cães ou suínos especificamente criados para o efeito a partir de uma colónia residente, e pelo menos duas semanas para suínos de proveniência externa. Os animais utilizados no estudo devem ser caracterizados quanto à espécie, estirpe, proveniência, sexo, peso e/ou idade. Os animais devem ser repartidos aleatoriamente pelos grupos de ensaio e de controlo. As gaiolas devem ser dispostas de modo a que eventuais efeitos devidos à respectiva colocação sejam minimizados. Deve atribuir-se a cada animal um número de identificação diferente.

1.4.3. **Preparação das doses**

A substância em estudo pode ser administrada através dos alimentos ou da água de beber, por sonda gástrica ou em cápsulas. O método de administração oral depende do objectivo do ensaio, bem como das propriedades físico-químicas da substância em estudo.

Se necessário, a substância é dissolvida ou suspensa num veículo adequado. Sempre que possível, recomenda-se que se considere primeiramente a possibilidade de se utilizar uma solução ou suspensão aquosa; em segundo lugar, uma solução ou emulsão em óleo (nomeadamente óleo de milho); e, por último, uma solução noutro veículo. No caso de se utilizar um veículo não aquoso, devem conhecer-se as respectivas características de toxicidade. Deve também determinar-se a estabilidade da substância nas condições de administração.

1.5. PROCEDIMENTOS

1.5.1. **Número e sexo dos animais**

Para cada dose devem utilizar-se, pelo menos, oito animais (quatro machos e quatro fêmeas). Caso se preveja o sacrifício de alguns animais durante o ensaio, o referido número deve ser acrescido do número de animais a sacrificar. O número de animais no final do estudo deve ser suficiente para permitir uma avaliação válida dos efeitos tóxicos. Com base em conhecimentos anteriores da substância em estudo ou de um análogo próximo, deverá considerar-se a possibilidade de incluir um lote extra de oito animais (quatro por sexo) no grupo de controlo e no grupo a que irá ser administrada a dose máxima, a fim de se observar, após o período de ensaio, a reversibilidade ou persistência de eventuais efeitos tóxicos. A duração deste período de observação deverá ser correctamente estabelecida tendo em conta os efeitos a observar.

▼B

1.5.2. **Dosagem**

Devem ser utilizadas pelo menos três doses e um controlo simultâneo, excepto nos casos em que seja realizado um ensaio-limite (ver 1.5.3). As doses poderão basear-se nos resultados de estudos de dose repetida ou de determinação da gama e deverão levar em conta todos os dados toxicológicos e toxicocinéticos existentes relativos ao composto em estudo ou a substâncias afins. A dose máxima deve ser seleccionada com a finalidade de provocar toxicidade, mas não a morte nem um sofrimento excessivo, a não ser que a natureza físico-química ou os efeitos biológicos da substância em estudo determinem que a referida dose seja limitada. Deve seleccionar-se uma sequência decrescente de doses, com o objectivo de evidenciar uma correlação entre a dose administrada e a reacção observada, bem como a ausência de efeitos adversos associados à administração da dose mínima (NOAEL). A diferença óptima entre as doses consiste, frequentemente, num factor de 2 a 4; em muitos casos, a utilização de um quarto lote de ensaio é preferível ao recurso a intervalos de grande amplitude (por exemplo, superior a um factor de 6-10) entre as doses.

O grupo de controlo deve ser constituído por animais aos quais não é administrada a substância em estudo ou um grupo de controlo do veículo se for utilizado um veículo para administrar a substância em estudo. Com excepção da exposição à substância em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser manuseados de forma idêntica aos outros animais. Caso se recorra a um veículo para a administração da substância em estudo, deve administrar-se o volume máximo do mesmo aos animais do lote de controlo. Se a substância em estudo for administrada através dos alimentos provocando um menor consumo alimentar, será vantajoso utilizar-se um grupo de controlo alimentado aos pares para se distinguir entre as reduções que se devem à palatabilidade e a alterações toxicológicos no modelo em estudo.

Deverão considerar-se as seguintes características do veículo e outros aditivos, conforme aplicável: efeitos ao nível da absorção, distribuição, metabolismo ou retenção da substância em estudo; efeitos nas propriedades químicas da substância em estudo susceptíveis de alterar as suas características tóxicas; e efeitos no consumo de alimentos ou água ou no estado nutricional dos animais.

1.5.3. **Ensaio-limite**

Sempre que um ensaio, realizado de acordo com o presente método, que utilize uma dose de, pelo menos, 1 000 mg/kg de massa corporal/dia, não produza efeitos tóxicos observáveis, ou se, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não se prevejam efeitos tóxicos, poderá não ser necessário efectuar um ensaio completo com três doses. Nestes casos justifica-se a realização de um ensaio-limite, excepto se a exposição humana indicar a necessidade de recurso a uma dose superior.

1.5.4. **Administração das doses**

A substância é administrada diariamente aos animais durante um período de 90 dias; em casos devidamente justificados, pode proceder-se à administração cinco dias por semana. A administração forçada deve efectuar-se numa dose única, por intermédio de uma sonda gástrica ou de uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido que pode administrar-se de cada vez depende das dimensões do animal. Normalmente, deve administrar-se o mínimo volume possível. Salvo no caso de substâncias corrosivas ou irritantes, cujos efeitos são, de modo geral, agravados em concentrações mais elevadas, devem minimizar-se as variações no volume mediante o ajustamento da concentração, de modo a assegurar um volume constante para todas as doses.

▼B

Caso a substância em estudo seja administrada através dos alimentos ou da água de beber, deve assegurar-se que as respectivas quantidades não perturbam o equilíbrio nutricional e hídrico normal. Se a substância for administrada com os alimentos, pode utilizar-se uma concentração alimentar constante, expressa em ppm, ou uma dose constante, expressa em relação à massa corporal dos animais; deve especificar-se a alternativa adoptada. No caso de uma substância administrada por meio de uma sonda gástrica ou cápsula, a dose deve ser administrada diariamente à mesma hora e, se necessário, ajustada de modo a manter uma dose constante em relação à massa corporal do animal. Caso um ensaio de 90 dias preceda um estudo da toxicidade crónica a longo prazo, é conveniente utilizar uma dieta semelhante em ambos os ensaios.

1.5.5. **Observações**

O período de observação deve ser de, pelo menos, 90 dias. Os animais incluídos nos lotes extra destinados a observações subsequentes devem ser mantidos em observação durante um período de tempo suficiente sem administração da substância em estudo, de modo a detectar a persistência ou a recuperação dos efeitos tóxicos.

Deve efectuar-se um exame clínico pelo menos uma vez por dia, de preferência à mesma hora, em função do período previsto de efeitos mais agudos devidos à administração da substância, registando-se o estado de saúde dos animais. Todos os animais deverão ser examinados pelo menos duas vezes por dia, normalmente ao princípio e ao fim de cada dia, a fim de se identificarem sinais de morbilidade e mortalidade.

Deve proceder-se a um exame clínico aprofundado de todos os animais pelo menos uma vez antes da primeira exposição (de modo a permitir efectuar comparações com o mesmo indivíduo) e uma vez por semana após a mesma. Estas observações devem ser feitas, caso possível, fora da gaiola, num recinto adequado, e de preferência sempre às mesmas horas. Deve procurar-se assegurar que as variações nas condições de observação sejam mínimas. Os sinais de toxicidade devem ser cuidadosamente registados, incluindo a hora a que se manifestaram, a sua intensidade e duração. As observações devem incluir alterações na pele, no pêlo, nos olhos e nas mucosas, bem como a ocorrência de secreções, excreções ou actividade autónoma (como, por exemplo, lacrimação, erecção pilosa, alterações nas pupilas, respiração anormal). Devem também registar-se quaisquer alterações da atitude, postura e reacção à manipulação, além da ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e comportamentos estereotipados (por exemplo, actos de higiene repetitivos, movimentos circulares repetitivos) ou estranhos.

Deve proceder-se a um exame oftalmológico, utilizando um oftalmoscópio ou equipamento equivalente adequado, antes de se iniciar a administração da substância em estudo e ao terminar o estudo, de preferência a todos os animais, mas pelo menos, aos animais dos grupos de dose máxima e de controlo. Se forem detectadas alterações nos olhos atribuíveis à substância em estudo, devem examinar-se todos os animais.

1.5.5.1. *Massa corporal e consumo de alimentos/água*

Todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana. O consumo de alimentos deve ser medido pelo menos uma vez por semana. Se a substância em estudo for administrada através da água de beber, deve também medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana. O consumo de água também poderá ser levado em conta em estudos dietéticos ou de administração forçada em que esse consumo se possa alterar.

▼B

1.5.5.2. *Hematologia e bioquímica clínica*

Devem colher-se amostras de sangue de um local designado e, caso aplicável, essas amostras deverão ser armazenadas em condições adequadas. No final do período de estudo serão colhidas amostras mesmo antes de se abaterem os animais ou como parte do procedimento de abate.

No início do estudo e, posteriormente, a intervalos mensais ou a meio do período do estudo, e, por último, no final do estudo, devem determinar-se os seguintes parâmetros hematológicos: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e medida do potencial de coagulação, como, por exemplo, tempo de coagulação, tempo de protrombina, ou tempo do tromboplastina.

Devem também efectuar-se determinações bioquímicas destinadas a investigar os principais efeitos tóxicos sobre os tecidos, nomeadamente renal e hepático, com amostras de sangue de todos os animais, colhidas no início do estudo, em seguida mensalmente ou a meio do período do estudo, e, por último, no final do período do estudo. As áreas de ensaio que devem ser consideradas são o equilíbrio electrolítico, o metabolismo dos hidratos de carbono, e as funções hepática e renal. A selecção de ensaios específicos será feita com base em observações do modo de acção da substância em estudo. Recomenda-se que os animais sejam jejuados durante um período de tempo adequado para a respectiva espécie antes de se proceder à colheita de amostras de sangue. Sugere-se que sejam determinados os seguintes parâmetros: cálcio, fósforo, cloreto, sódio, potássio, glicose em jejum, alanina-aminotransferase, aspartato-aminotransferase, ornitina descarboxilase, gama-glutamil-transpeptidase, nitrogénio ureico, albumina, creatinina no sangue, bilirrubina total e proteína sérica total.

Devem efectuar-se determinações na urina pelo menos no início, seguidamente a meio, e, por último, no final do estudo de acordo com um programa previamente estabelecido. As determinações a efectuar na urina devem incluir a aparência, volume, osmolalidade ou gravidade específica, pH, proteínas, glicose e sangue/hematócitos. Caso necessário, poderão utilizar-se outros parâmetros a fim de alargar o estudo de um ou mais efeitos observados.

Além disso, deve prever-se a pesquisa de marcadores séricos que forneçam indicações gerais sobre a lesão de tecidos. Entre outras determinações que poderão ser necessárias para uma avaliação toxicológica adequada referem-se análises de lípidos, hormonas, equilíbrio ácidos/bases, meta-hemoglobina e inibição da colinesterase. Caso necessário, poderão efectuar-se outras determinações bioquímicas para alargar o estudo dos efeitos observados. A necessidade de efectuar tais determinações é estabelecida em função do tipo de substância em estudo ou de cada caso específico.

De um modo geral, deve adoptar-se uma abordagem flexível, em função das espécies e dos efeitos observados e/ou previstos da substância em causa.

1.5.5.3. *Autópsia geral*

Todos os animais devem ser objecto de uma autópsia geral pormenorizada que inclua o exame da superfície exterior do corpo, dos orifícios e das cavidades craniana, torácica e abdominal, bem como do respectivo conteúdo. Devem remover-se de modo adequado as membranas aderentes a órgãos tais como o fígado (com a vesícula), os rins, as glândulas supra-renais, os testículos, os epidídimos, os ovários, o útero, a tiróide (com paratiróides), o timo, o baço, o cérebro e o coração, cuja massa húmida deve ser determinada logo que possível após a dissecação, de modo a evitar a respectiva dessecação. Este procedimento aplica-se a todos os animais (excepto os que estiverem moribundos ou tiverem sido abatidos no decurso do ensaio).

▼B

Os órgãos e tecidos que se seguem devem ser conservados num meio de fixação adequado aos mesmos, bem como ao tipo de exame histopatológico subsequente: todos os tecidos que apresentem lesões evidentes, encéfalo (regiões representativas, nomeadamente cérebro, cerebelo e protuberância), espinal medula (a três níveis: cervical, médio-torácico e lombar), pituitária, olhos, tiróide, paratiróide, timo, esófago, glândulas salivares, estômago, intestino delgado e cólon (incluindo as placas de Peyer), fígado, vesícula, pâncreas, rins, glândulas supra-renais, baço, coração, timo, tiróide, traqueia e pulmões, aorta, gónadas, útero, órgãos genitais acessórios, glândula mamária feminina, bexiga, gânglios linfáticos (de preferência um gânglio situado na via de administração e um gânglio distante da mesma, de modo a investigar possíveis efeitos sistémicos), nervos periféricos (ciático ou tibial), de preferência na proximidade de músculos, e uma secção de medula óssea (ou, como alternativa, um aspirado de medula óssea recentemente montado) e pele. Em função das observações clínicas ou de natureza diversa efectuadas, poderá ser necessário examinar outros tecidos. Devem também conservar-se quaisquer órgãos susceptíveis de constituírem alvos da substância em estudo, em virtude das propriedades conhecidas da mesma.

1.5.5.4. *Histopatologia*

Deve proceder-se ao exame histopatológico dos órgãos e tecidos conservados dos animais dos grupos de controlo, bem como dos lotes sujeitos a doses elevadas. Caso o exame destes últimos revele alterações atribuíveis à substância em estudo, devem examinar-se também os animais de todos os lotes restantes.

Devem examinar-se todas as lesões importantes.

Sempre que se recorra a um lote extra, deve proceder-se ao exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos restantes lotes.

2. RESULTADOS E SUA APRESENTAÇÃO

2.1. DADOS

Devem registar-se os dados relativos a cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, referindo-se, para cada lote de ensaio, o número de animais no início do ensaio, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou abatidos por uma questão de humanidade, a hora da morte de cada animal, o número de animais que apresentam sinais de toxicidade, a descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o tempo decorrido até à respectiva manifestação, bem como a sua duração e gravidade, o número de animais que apresentem lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais que apresentam cada tipo de lesões.

Caso aplicável, os resultados numéricos devem ser avaliados segundo um método estatístico adequado e geralmente aceite. Os métodos estatísticos e dados a serem analisados devem ser seleccionados durante a fase de concepção do estudo.

2.2. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

▼B

2.2.1. **Substância em estudo:**

— natureza física, pureza e propriedades físico-químicas,

— dados de identificação

— veículo (caso aplicável): justificação da escolha de um veículo não aquoso.

2.2.2. **Espécie submetida ao ensaio:**

— espécie e a estirpe utilizada,

— número, idade e sexo dos animais,

— origem, condições de acomodação, alimentação, etc.,

— massa de cada animal no início do ensaio.

2.2.3. **Condições do ensaio:**

— justificação para a selecção das doses,

— pormenores relativos à preparação da substância em estudo e à sua eventual incorporação nos alimentos, nomeadamente a respectiva concentração, estabilidade e homogeneidade,

— modo de administração da substância em estudo,

— doses reais (mg/kg massa corporal/dia) e factor de conversão da concentração da substância em estudo na alimentação/abeberação (ppm) para a dose real, quando aplicável,

— pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água.

2.2.4. **Resultados:**

— massa corporal e respectivas alterações,

— consumo de alimentos e de água, se for caso disso,

— reacções tóxicas em função do sexo e da dose administrada, nomeadamente sinais de toxicidade,

— natureza, gravidade e duração dos sinais clínicos (reversíveis ou não),

— exame oftalmológico,

— resultados da análise hematológica, acompanhados dos respectivos parâmetros de base,

— resultados da análise bioquímica, acompanhados dos respectivos parâmetros de base,

— massa corporal final, massa dos órgãos e relações massas dos órgãos/massa corporal,

— dados obtidos por autópsia,

— descrição pormenorizada dos resultados do exame histopatológico,

— dados de absorção, caso se encontrem disponíveis,

— eventual tratamento estatístico dos resultados.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

▼B

B.28. **TOXICIDADE DÉRMICA SUBCRÓNICA: TESTE DE DOSE REPETIDA POR VIA DÉRMICA, A 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 expor e da dimensão da superfície a tratar. Sempre que se testam substâncias sólidas, que podem ser pulverizadas se necessário, 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.

▼B

Número e sexo

Para cada dose serão utilizados pelo menos 20 animais (10 fêmeas e 10 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 sacrificar. Para além destes poderá haver um grupo-satélite de 20 animais (10 de cada sexo) tratado com a dose mais elevada, durante 90 dias e observado quanto à reversibilidade, à persistência ou aparecimento tardio de efeitos tóxicos durante 28 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 bissemanalmente), de modo a manter-se constante relativamente ao peso corporal do animal. Os animais do grupo de controlo serão tratados da mesma maneira que os animais 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.

▼B

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 90 dias.

Os animais de todos os grupos-satélite que forem objecto de observações complementares serão mantidos vivos durante mais 28 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 antialérgico. 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;

▼B

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 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 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, torácica e abdominal e respectivos conteúdos. O fígado, os rins, as glândulas supra-renais 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 órgãos 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, gónadas, útero, órgãos 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, mediotorácica 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 órgão-alvo.

Exame histopatológico

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

b) Todas as lesões macroscópicas serão examinadas;

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

▼B

c) Os órgãos-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 órgãos que apresentem lesões no grupo tratado com a dose mais elevada;

e) Quando se usar um grupo satélite, será feito um exame histopatológico aos tecidos e órgãos 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. Os resultados serão avaliados por meio de 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 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,

▼B

— 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.

▼M4

B.29. TOXICIDADE SUBCRÓNICA POR INALAÇÃO: ESTUDO DE 90 DIAS

RESUMO

Este método B.29 revisto visa caracterizar integralmente a toxicidade por via inalatória do produto químico estudado, após um período de duração subcrónica (90 dias), e obter dados sólidos para quantificar os riscos por inalação. Expõem-se durante 90 dias (13 semanas), seis horas por dia, grupos constituídos por dez roedores machos e dez roedores fêmeas a três ou mais concentrações do produto químico em estudo (a), a ar filtrado (b, controlo negativo), e/ou ao veículo (c, controlo do veículo). Em geral, Os animais são expostos durante cinco dias por semana, mas admite-se que sejam expostos sete dias por semana. Ensaiam-se sempre machos e fêmeas, mas cada sexo pode ser exposto a concentrações diferentes, se um deles for reconhecidamente mais sensível ao produto químico do que o outro. Este método concede ao diretor do estudo flexibilidade suficiente para incluir grupos satélites (para apreciação da reversibilidade), eutanásias intercalares, lavagens broncoalveolares, testes neurológicos e exames histopatológicos e de patologia clínica suplementares, a fim de melhor caracterizar a toxicidade do produto químico em estudo.

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 413 (2009) da OCDE. O *Test Guideline* 413 (TG 413) inicial relativo à toxicidade subcrónica por inalação foi adotado em 1981 (1). O presente método B.29 é equivalente ao método TG 413 revisto (2009), tendo sido atualizado para refletir o estado da ciência e cumprir exigências atuais e futuras da regulamentação.

2. Os estudos de toxicidade subcrónica por inalação destinam-se principalmente a aferir das concentrações que a regulamentação deve prever para a avaliação dos riscos a que os trabalhadores estão sujeitos no local de trabalho. São igualmente utilizados para avaliar os riscos de exposição humana nos locais de habitação, associados aos meios de transporte e no ambiente. O método permite caracterizar os efeitos adversos resultantes da exposição diária por inalação, durante 90 dias (cerca de 10 % do tempo de vida do rato), ao produto químico em estudo. Os dados provenientes dos estudos de toxicidade subcrónica por inalação podem utilizar-se para quantificar riscos e para selecionar as concentrações a utilizar em estudos de toxicidade crónica. O presente método não se destina especificamente ao ensaio de nanomateriais. No final do capítulo e no documento de orientações n.º 39 (2) definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

3. A fim de melhorar a qualidade do estudo e de minimizar a utilização a animais, antes de realizar o estudo o laboratório de ensaios deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa. Entre os elementos úteis para a escolha das concentrações mais adequadas contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, resultados de ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana, dados (Q)SAR — "*(quantitative) structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins e dados provenientes de outros estudos de exposição repetida. Se estiver prevista a ocorrência ou ocorrerem manifestações de neurotoxicidade durante o estudo, fica ao critério do diretor deste incluir no estudo as avaliações suplementares que considere adequadas, tais como uma bateria de observações funcionais e determinações da atividade motora. Embora o momento da exposição possa ser um aspeto crítico em determinados exames, a realização destes estudos suplementares não deve interferir na conceção do estudo principal.

▼M4

4. No caso dos produtos químicos corrosivos ou irritantes, podem ensaiar-se diluições adequadas, a concentrações que gerem o grau de toxicidade pretendido. Para mais informações, ver o documento de orientações n.º 39 (2). Ao expor animais a produtos químicos com tais características, as concentrações visadas devem ser suficientemente baixas para não causarem dor ou sofrimento intensos, sem deixarem de ser suficientes para que a curva de resposta à concentração abranja os níveis correspondentes aos objetivos do ensaio, nos planos científico e da regulamentação. Estas concentrações devem ser adaptadas a cada caso, de preferência com base num estudo exploratório convenientemente concebido, que forneça informações sobre o parâmetro crítico, eventuais limiares de irritação e o momento do aparecimento dos efeitos (ver os pontos 11 a 13). É necessário justificar as concentrações escolhidas em cada caso.

5. Os animais moribundos ou que apresentem sinais óbvios de dor ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados. Os animais moribundos são equiparados aos que morrem durante o ensaio. O documento de orientações da OCDE relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (3) define os critérios que devem presidir à decisão de eutanasiar animais moribundos ou em grande sofrimento, bem como orientações sobre o reconhecimento da morte previsível ou iminente.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

6. Devem ser utilizados roedores adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais de uso corrente. A espécie preferida é o rato. É necessário justificar o recurso a outras espécies.

Preparação dos animais

7. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas. No dia da seleção aleatória, os animais devem ser adultos jovens com sete a nove semanas, de peso corporal não desviado mais de 20 % do peso médio correspondente a cada sexo. Selecionam-se os animais aleatoriamente, marcam-se para identificação individual e mantêm-se nas suas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início do ensaio, para aclimatação às condições laboratoriais.

Manutenção dos animais

8. É necessário identificar individualmente cada animal, de preferência com um respondedor (*transponder*) subcutâneo, para facilitar as observações e evitar confusões. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. O ideal será manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, embora isto possa não ser possível ao utilizar água como veículo. Antes e depois das exposições, os animais são geralmente engaiolados por sexo e por concentração, mas o número de animais por gaiola não deve dificultar a clara observação de cada animal e deve minimizar as perdas devidas a lutas ou canibalismo. Quando se opta pela exposição unicamente nasal dos animais, pode ser necessário aclimatá-los aos tubos de contenção. Estes não devem provocar aos animais tensões físicas, térmicas ou dinâmicas excessivas. A contenção dos animais pode afetar parâmetros fisiológicos como a temperatura corporal (hipertermia) e/ou o volume respirado por minuto. Caso se disponha de dados genéricos reveladores de que nenhuma destas alterações ocorre em grau apreciável, não será necessária a adaptação prévia aos tubos de contenção. Os animais cujo corpo seja exposto na totalidade a um aerossol devem permanecer em gaiolas individuais durante a exposição, para evitar que o aerossol seja filtrado pela pelagem dos que com eles coabitem. Exceto nos períodos de exposição, podem utilizar-se dietas convencionais certificadas de laboratório, com fornecimento ilimitado de água potável da rede pública. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão.

▼M4

Câmaras de inalação

9. Ao escolher-se a câmara de inalação, deve ter-se em conta a natureza do produto químico em estudo e o objetivo do ensaio. Privilegia-se o modo de exposição unicamente nasal, termo que abrange as exposições "unicamente da cabeça", "unicamente do nariz" e "unicamente do focinho". A exposição unicamente nasal é geralmente preferida no estudo de aerossóis de líquidos ou de sólidos, ou de vapores que possam condensar-se e formar aerossóis. Para determinados objetivos do estudo, poderá ser melhor recorrer ao modo de exposição de corpo inteiro, mas será necessário justificá-lo no relatório. Para garantir estabilidade atmosférica nas câmaras de corpo inteiro, o volume de todos os animais presentes em cada câmara não deve exceder 5 % do volume da câmara. O documento GD 39 (2) descreve os princípios, vantagens e desvantagens das técnicas de exposição unicamente nasal e de corpo inteiro.

ESTUDOS DA TOXICIDADE

Concentrações-limite

10. Contrariamente aos estudos de toxicidade aguda, nos estudos de toxicidade subcrónica por inalação não está definida nenhuma concentração-limite. Na escolha da concentração máxima a ensaiar, deve ter-se em conta a concentração máxima atingível, o nível de exposição humana mais desfavorável, a necessidade de manter um fornecimento adequado de oxigénio e/ou considerações de bem-estar animal. Se os dados disponíveis não permitirem estabelecer limites, podem utilizar-se os valores-limite de exposição aguda fixados no Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (13) — concentração máxima até 5 mg/l para aerossóis, 20 mg/l para vapores e 20 000 ppm para gases; ver igualmente o GD 39 (2). Se for necessário exceder estes limites ao ensaiar gases ou produtos químicos muito voláteis (por exemplo, refrigerantes), haverá que justificá-lo. A concentração-limite deve induzir efeitos tóxicos inequívocos sem gerar tensões desnecessárias nos animais nem afetar a longevidade dos mesmos (3).

Estudo exploratório

11. Antes de iniciar o estudo principal, é geralmente necessário realizar um estudo exploratório. Um estudo exploratório com as características aqui definidas é mais completo do que um estudo preliminar, por não se limitar à escolha das concentrações. O êxito do estudo principal pode depender dos conhecimentos adquiridos num estudo exploratório. Este pode, por exemplo, fornecer informações técnicas sobre métodos de análise, granulometria, mecanismos de toxicidade, dados histopatológicos e de patologia clínica e estimativas do nível sem observação de efeitos adversos (NOAEL) e da concentração máxima tolerada no estudo principal. Fica ao critério do diretor do estudo recorrer a um estudo exploratório para determinar o limite mínimo de irritação do aparelho respiratório (por exemplo, por meio de uma histopatologia do aparelho respiratório, de testes da função pulmonar ou de uma lavagem broncoalveolar), a concentração máxima que os animais toleram sem tensões excessivas e os parâmetros que melhor caracterizam a toxicidade do produto químico em estudo.

12. O estudo exploratório pode abranger uma ou mais concentrações. Consoante os parâmetros escolhidos, devem expor-se a cada concentração três a seis machos e três a seis fêmeas. A duração deste estudo varia entre cinco dias, no mínimo, e geralmente não mais de 28 dias. É necessário justificar no relatório as concentrações escolhidas para o estudo principal. O objetivo deste último é demonstrar a existência de uma relação entre a concentração e a resposta obtida para o parâmetro previsivelmente mais sensível. Idealmente, a concentração mais baixa deve ser a concentração sem efeitos adversos observáveis e a concentração mais alta deve induzir efeitos tóxicos inequívocos, sem gerar tensões desnecessárias nos animais nem afetar a longevidade dos mesmos (3).

▼M4

13. Ao escolher os níveis de concentração para o estudo exploratório, devem ponderar-se todas as informações disponíveis, incluindo relações estrutura-atividade e dados relativos a produtos químicos semelhantes (ver o ponto 3). O estudo exploratório pode confirmar ou refutar a escolha dos parâmetros mais sensíveis segundo critérios mecanísticos, por exemplo, a inibição da colinesterase por organofosfatos, a formação de meta-hemoglobina por agentes eritrocitotóxicos, as hormonas tiroideias (T_3 e T_4), no caso dos agentes tirotóxicos, proteínas, a LDH, ou a presença de neutrófilos na lavagem broncoalveolar, no caso de partículas inócuas fracamente solúveis ou de aerossóis irritantes dos pulmões.

Estudo principal

14. Um estudo principal de toxicidade subcrónica compreende geralmente três níveis de concentração, bem como, em paralelo, os controlos negativo (do ar) e/ou do veículo (ver o ponto 18). Para facilitar a seleção dos níveis de exposição, devem ser utilizados todos os dados disponíveis, nomeadamente resultados de estudos de toxicidade sistémica, metabólicos e cinéticos (deve ter-se especial cuidado em evitar níveis de concentração elevados que saturem os processos cinéticos). Cada grupo de ensaio compreende a exposição de dez roedores machos e dez roedores fêmeas ao produto químico em estudo, durante seis horas por dia e cinco dias por semana, ao longo de treze semanas (a duração total do estudo é, pelo menos, de 90 dias). Os animais também podem ser expostos sete dias por semana (por exemplo, ao ensaiar produtos farmacêuticos inalados). Se um dos sexos for reconhecidamente mais sensível ao produto químico em estudo, pode expor-se cada sexo a concentrações diferentes das utilizadas para o outro, a fim de otimizar a resposta à concentração como se refere no ponto 15. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Se a duração da exposição for inferior a seis horas por dia ou se for necessário realizar um estudo de exposição de longa duração (por exemplo, 22 horas por dia) de corpo inteiro [ver o GD 39 (2)], será necessário justificá-lo. Durante o período de exposição, a alimentação deve ser suspensa, exceto se a exposição exceder seis horas. Durante as exposições de corpo inteiro pode continuar a fornecer-se água.

15. As concentrações visadas escolhidas devem permitir identificar o(s) órgão(s)-alvo e evidenciar uma relação clara entre a concentração e a resposta obtida:

— o nível de concentração mais elevado deve gerar efeitos tóxicos, mas não causar sintomas deletérios nem mortalidade, que impediriam a interpretação dos resultados,

— o espaçamento do nível ou níveis de concentração intermédios deve permitir uma gradação dos efeitos tóxicos entre os correspondentes aos das concentrações mais baixa e mais elevada,

— o nível de concentração mais baixo não deve ter efeitos tóxicos ou, se os tiver, estes devem ser reduzidos.

Eutanásias intercalares

16. Caso esteja prevista no estudo a realização de eutanásias intercalares, os efetivos expostos a cada nível de concentração devem ser aumentados no número de animais a eutanasiar antes da conclusão do estudo. É necessário fundamentar a realização de eutanásias intercalares e as análises estatísticas devem tê-las devidamente em conta.

▼M4

Estudo de grupos satélites (para apreciação da reversibilidade)

17. Pode recorrer-se a um estudo satélite para observar a reversibilidade, a persistência ou o aparecimento diferido de efeitos tóxicos durante um período adequado, não inferior a 14 dias, após o termo da exposição. Compõem estes grupos dez machos e dez fêmeas, que são expostos ao mesmo tempo que os animais ensaiados no estudo principal. Os animais dos grupos satélites são expostos à concentração mais elevada do produto químico em estudo e devem ser complementados pelos grupos necessários de controlo do ar e/ou do veículo em paralelo (ver o ponto 18).

Animais de controlo

18. Os animais de controlo negativo (do ar) em paralelo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos que participam no ensaio principal, exceto que são expostos a ar filtrado em vez de ao produto químico em estudo. Se for utilizada água ou outra substância para gerar a atmosfera ensaiada, deve incluir-se no estudo, em vez do grupo de controlo negativo (do ar), um grupo de controlo do veículo. Sempre que possível, o veículo utilizado deve ser água. Se assim for, os animais são expostos a controlo a ar com a mesma humidade relativa que o ar utilizado para os grupos expostos ao produto químico em estudo. A escolha do veículo mais adequado deve basear-se em dados históricos ou num estudo prévio convenientemente realizado. Se não se conhecer bem a toxicidade do veículo, fica ao critério do diretor do estudo utilizar em simultâneo um controlo negativo (do ar) e um controlo do veículo, embora se desaconselhe fortemente este procedimento. Se os dados históricos revelarem que o veículo não é tóxico, não haverá necessidade de um grupo de controlo negativo (do ar) e apenas deve utilizar-se um controlo do veículo. Se um estudo prévio de um produto químico incorporado num determinado veículo não revelar toxicidade, conclui-se que o veículo em causa não é tóxico à concentração ensaiada, devendo utilizar-se esse controlo do veículo.

CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Administração das concentrações

19. Os animais são expostos ao produto químico em estudo sob a forma de gás, vapor, aerossol ou de uma mistura destes. O estado físico a ensaiar depende das propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, das concentrações escolhidas e/ou da forma física cuja probabilidade de presença durante a manipulação e utilização do mesmo seja maior. Os produtos químicos higroscópicos ou quimicamente reativos devem ser ensaiados em atmosfera seca. Devem tomar-se precauções para evitar concentrações que possam provocar explosões. As matérias em partículas podem ser sujeitas a processos mecânicos para reduzir a granulometria. Para mais orientações, consultar o documento GD 39 (2).

Distribuição granulométrica

20. Os aerossóis e os vapores que possam condensar-se em aerossóis devem ser objeto de análise granulométrica. Para que todas as zonas pertinentes do aparelho respiratório sejam expostas, recomenda-se a utilização de aerossóis com diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) compreendido entre 1 μm e 3 μm e desvio-padrão geométrico (σ_g) compreendido entre 1,5 e 3,0 (4). Deve fazer-se o razoavelmente possível para respeitar estas condições, sendo necessário um parecer especializado caso isso não se consiga. Por exemplo, as partículas dos fumos metálicos são mais pequenas do que o limite inferior indicado, ao passo que as partículas carregadas e as fibras podem exceder o limite superior.

▼M4

Incorporação do produto químico em estudo num veículo

21. Idealmente, o produto químico em estudo deve ser ensaiado sem que tenha sido incorporado num veículo. Se for necessário utilizar um veículo para obter a concentração e a granulometria adequadas do produto químico em causa, deve preferir-se a água. Se o produto químico for dissolvido num veículo, será necessário comprovar que se mantém estável.

MONITORIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Caudal de ar nas câmaras

22. Durante cada exposição, é necessário regular cuidadosamente, monitorizar continuamente e registar pelo menos de hora a hora o caudal de ar através de cada câmara. A monitorização em tempo real da concentração (ou estabilidade no tempo) da atmosfera em estudo constitui uma medida permanente de todos os parâmetros dinâmicos e um meio indireto de regular os que têm importância para a inalação. Se a concentração for monitorizada em tempo real, pode reduzir-se a frequência da medição do caudal de ar a apenas uma medição diária por exposição. É necessário ter especial cuidado em evitar reinalações nas câmaras de exposição unicamente nasal. A concentração de oxigénio não deve ser inferior a 19 % e a concentração de dióxido de carbono não deve exceder 1 %. Se houver razões para crer que estas concentrações não são respeitadas, é necessário medi-las. Se as medições efetuadas no primeiro dia de exposição mostrarem que as concentrações destes gases estão aos níveis corretos, não é necessário voltar a medi-las.

Temperatura e humidade relativa nas câmaras

23. Deve manter-se a temperatura nas câmaras a 22 °C ± 3 °C. Tanto no caso das exposições unicamente nasais como das exposições do corpo inteiro, é necessário monitorizar continuamente a humidade relativa na zona de respiração dos animais e, se possível, registá-la de hora a hora durante cada exposição. É preferível manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, mas isso pode não ser possível (por exemplo, quando se estudam misturas aquosas) ou pode não ser mensurável (devido a interferências do produto químico em estudo com o método de ensaio).

Concentração nominal do produto químico em estudo

24. Sempre que possível, deve calcular-se e registar-se a concentração nominal na câmara de exposição. Esta é dada pela divisão da massa gerada do produto químico em estudo pelo volume de ar total que circulou pelo sistema da câmara de inalação. A concentração nominal não é utilizada para caracterizar a exposição dos animais, mas a sua comparação com a concentração real dá uma indicação da eficácia de geração do sistema de ensaio, podendo ser utilizada para detetar problemas a esse nível.

Concentração real do produto químico em estudo

25. Entende-se por "concentração real do produto químico em estudo", a concentração do produto químico nas amostras colhidas na zona de respiração dos animais da câmara de inalação. As concentrações reais podem determinar-se por métodos específicos (por exemplo, amostragem direta ou métodos de adsorção ou de reação química e posterior caracterização analítica) ou por métodos inespecíficos, tais como gravimetria após filtração. O método gravimétrico só é aceitável para aerossóis de pós com um único componente ou de líquidos pouco voláteis e deve apoiar-se em caracterizações adequadas específicas do produto químico em causa efetuadas antes da realização do estudo. A concentração de aerossóis de pós com vários componentes também pode determinar-se por gravimetria. Todavia, são necessários para isso dados analíticos que demonstrem que a composição do

▼M4

produto transportado no aerossol é semelhante à do produto inicial. Se não se dispuser desses dados, pode ser necessário reanalisar periodicamente o produto químico em estudo (idealmente no aerossol) durante o ensaio. No caso dos agentes aerossolizados que possam evaporar-se ou sublimar, é necessário demonstrar que todas as fases são recolhidas pelo método escolhido.

26. Deve utilizar-se, se possível, apenas um lote do produto químico em estudo durante os ensaios e a amostra em estudo deve ser conservada em condições que preservem a sua pureza, homogeneidade e estabilidade. Antes de iniciar o estudo, deve caracterizar-se o produto químico em causa no que respeita à sua pureza e, se tecnicamente viável, à sua identidade e às quantidades dos contaminantes e impurezas nele identificados. Para o efeito, pode recorrer-se, entre outros, aos seguintes dados: tempos de retenção e áreas relativas de picos, pesos moleculares obtidos por espetrometria de massa ou cromatografia em fase gasosa ou outras estimativas. Embora a identidade da amostra a estudar não seja da responsabilidade do laboratório, pode ser aconselhável que este confirme, pelo menos, alguns aspetos da caracterização efetuada pelo cliente (cor, natureza física, etc.).

27. Deve manter-se a atmosfera de exposição tão constante quanto possível. Para demonstrar a estabilidade das condições de exposição, pode utilizar-se um dispositivo de monitorização em tempo real, tal como um fotómetro de aerossóis, para esses casos, ou, para vapores, um analisador de hidrocarbonetos totais. Deve medir-se a concentração real na câmara pelo menos três vezes por nível de exposição, em cada dia de exposição. Se isso não for viável, por limitações relacionadas com o caudal de ar ou devido a concentrações baixas, aceita-se uma amostra por período de exposição. Idealmente, essa amostra deve então ser colhida ao longo de todo o período de exposição. A concentração na câmara correspondente a uma determinada amostra não deve desviar-se da concentração média na câmara mais de 10 %, no caso de gases e vapores, nem mais de 20 %, no caso de aerossóis de líquidos ou de sólidos. Deve calcular-se e indicar-se no relatório o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio (t_{95}). A duração da exposição corresponde ao tempo de geração do produto químico em estudo, incluído o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio (t_{95}) e para o decaimento da concentração. O documento GD 39 (2) contém orientações para a estimativa do t_{95}.

28. No caso de misturas muito complexas de gases ou vapores e de aerossóis (por exemplo, atmosferas de combustão e produtos químicos gerados por produtos ou dispositivos finais específicos), o comportamento de cada fase na câmara de inalação pode ser diferente. Por esse motivo, deve escolher-se em cada fase (gás ou vapor e aerossol) pelo menos uma substância indicadora (substância analisada), normalmente o principal ingrediente ativo da mistura. Se o produto químico em estudo for uma mistura, deve indicar-se no relatório a concentração analítica correspondente à mistura e não apenas a concentração correspondente ao ingrediente ativo ou à substância indicadora (substância analisada) em causa. O documento GD 39 (2) contém mais informações sobre as concentrações reais.

Distribuição granulométrica do produto químico em estudo

29. Deve determinar-se a distribuição granulométrica dos aerossóis pelo menos semanalmente por nível de concentração, recorrendo a um impactor de cascata ou a outro instrumento, tal como um granulómetro aerodinâmico. Se for possível demonstrar a equivalência dos resultados obtidos pelo impactor de cascata e pelo instrumento alternativo, pode utilizar-se este último em todo o estudo.

▼M4

30. Em paralelo ao instrumento primário, deve utilizar-se um segundo dispositivo, tal como um filtro gravimétrico ou um borbulhador de gás/impactor *impinger*, para confirmar a eficiência de captação do primeiro. As concentrações mássicas obtidas por análise granulométrica e por análise com filtros não devem diferir entre si mais do que valores razoáveis [ver o GD 39 (2)]. Se for possível demonstrar esta equivalência, a todas as concentrações ensaiadas, no início do estudo, não é necessário efetuar mais medições de confirmação. Por razões de bem-estar animal, devem tomar-se medidas para minimizar dados inconclusivos que possam obrigar à repetição do estudo.

31. É necessário efetuar uma análise granulométrica no caso dos vapores que possam condensar-se para formar aerossóis ou se forem detetadas partículas numa atmosfera de vapores suscetível de formar fases mistas.

EXAMES

32. Os animais devem ser examinados clinicamente antes, durante e depois do período de exposição. Consoante a resposta dos animais durante a exposição, pode ser conveniente aumentar a frequência dos exames. Se for difícil examinar os animais devido aos tubos de contenção utilizados, à reduzida iluminação das câmaras de corpo inteiro ou à opacidade da atmosfera, deve-se examiná-los cuidadosamente depois da exposição. Os exames realizados antes da exposição do dia seguinte podem apreciar a eventual reversibilidade ou intensificação dos efeitos tóxicos.

33. Todos os exames devem ser registados, mantendo registos individuais para cada animal. Se forem eutanasiados animais ou forem encontrados animais mortos, deve registar-se o momento da morte com a maior exatidão possível.

34. Os exames a efetuar aos animais engaiolados devem incidir, nomeadamente, nas alterações da pele e da pelagem, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do sistema circulatório, do sistema nervoso, da atividade somatomotora e do comportamento. Deve estar-se atento a tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. A medição da temperatura retal pode corroborar uma bradipneia reflexa ou uma hipo/hipertermia relacionadas com a exposição ou com o confinamento. Entre as avaliações suplementares que podem incluir-se no protocolo de estudo contam-se as de parâmetros cinéticos ou ao nível da biomonitorização, da função pulmonar, da retenção de matérias fracamente solúveis acumuladas no tecido pulmonar e de alterações comportamentais.

PESO CORPORAL

35. Regista-se o peso de cada animal pouco antes da primeira exposição (dia 0) e, em seguida, duas vezes por semana (por exemplo, às sextas-feiras e às segundas-feiras, para verificar a recuperação durante o fim de semana sem exposição, ou intervaladas de modo a possibilitar a avaliação da toxicidade sistémica), bem como no momento da morte ou da eutanásia. Se não se registarem efeitos nas quatro primeiras semanas, durante o resto do estudo podem medir-se os pesos corporais apenas uma vez por semana. Os animais que integram os (eventuais) grupos satélites (para apreciação da reversibilidade) devem continuar a ser pesados semanalmente durante o período de recuperação. No termo do estudo, pesa-se cada animal pouco antes de ser eutanasiado, para não falsear o cálculo da relação entre o peso de cada órgão e o peso corporal.

CONSUMO DE ALIMENTOS E DE ÁGUA

36. Mede-se semanalmente o consumo de alimentos, podendo também medir-se o consumo de água.

▼M4

PATOLOGIA CLÍNICA

37. Efetua-se uma avaliação de patologia clínica a todos os animais depois de eutanasiados, incluindo os dos grupos de controlo e dos grupos satélites (para apreciação da reversibilidade). Regista-se o lapso de tempo entre o termo da exposição e a colheita de sangue, em especial quando a reconstituição do parâmetro visado é rápida. Recomenda-se que, após o termo da exposição, se colham amostras para análise dos parâmetros com tempo de meia-vida plasmático curto – por exemplo, a carboxi-hemoglobina (COHb), a colinesterase (CHE), e a meta-hemoglobina (MetHb).

38. Enumera-se no quadro 1 os parâmetros de patologia clínica normalmente exigidos nos estudos toxicológicos. A análise da urina não é exigida por rotina, mas pode efetuar-se quando a toxicidade prevista ou observada o aconselharem. Fica ao critério do diretor do estudo decidir avaliar outros parâmetros, para melhor caracterização da toxicidade do produto químico (por exemplo, colinesterase, lípidos, hormonas, equilíbrio ácido-base, meta-hemoglobina ou corpos de Heinz, creatinina-cinase, relação mieloide/ /eritroide, troponinas, gases no sangue arterial, lactato-desidrogenase, sorbitol-desidrogenase, glutamato-desidrogenase e gama-glutamil-transpeptidase).

Quadro 1

Parâmetros clássicos de patologia clínica

Hematologia	
Contagem de eritrócitos	Contagem total de leucócitos
Hematócrito	Fórmula leucocitária
Concentração de hemoglobina	Contagem de plaquetas
Hemoglobina corpuscular média	Potencial de coagulação (escolher um):
Volume corpuscular médio	— tempo de protrombina
Concentração de hemoglobina corpuscular média	— tempo de coagulação
Reticulócitos	— tempo de tromboplastina parcial
Química clínica	
Glucose (*)	Alanina-aminotransferase
Colesterol total	Aspartato-aminotransferase
Triglicéridos	Fosfatase alcalina
Azoto ureico no sangue	Potássio
Bilirrubina total	Sódio
Creatinina	Cálcio
Proteínas totais	Fósforo
Albumina	Cloretos
Globulina	
Análise da urina (facultativa)	
Aspeto (cor e turvação)	Proteínas totais
Volume	Glucose
Densidade ou osmolalidade	Sangue/células sanguíneas
pH	

(*) Dado que um período longo de jejum pode distorcer as determinações da glucose dos animais expostos relativamente aos animais dos grupos de controlo, fica ao critério do diretor do estudo fazer ou não os animais jejuar. Se a opção for por um período de jejum, este deve ser adaptado à espécie — no caso do rato, pode ser de 16 horas (jejum noturno). Pode determinar-se a glucose em jejum após jejum noturno durante a última semana de exposição ou após jejum noturno antes da autópsia (neste caso, juntamente com todos os outros parâmetros de patologia clínica).

▼M4

39. Se houver indícios de que a zona principal de deposição e retenção são as vias respiratórias inferiores (isto é, os alvéolos), a lavagem broncoalveolar pode ser a técnica mais adequada para efetuar uma análise quantitativa de parâmetros que hipoteticamente permitam avaliar a relação entre a dose e os efeitos por esta induzidos, com especial incidência para alveolites, inflamações pulmonares e fosfolipidose. Este processo permite estudar convenientemente os efeitos nos alvéolos das doses aplicadas e a evolução das lesões alveolares daí resultantes. Podem determinar-se no fluido da lavagem broncoalveolar a contagem total de leucócitos, a fórmula leucocitária, as proteínas totais e a lactato-desidrogenase. Outros parâmetros eventualmente a ponderar são os indicativos de alterações lisossómicas, fosfolipidose, fibrose, bem como de irritações e reações inflamatórias alérgicas, que podem compreender a determinação de citocinas ou quimiocinas pró-inflamatórias. As determinações no fluido proveniente da lavagem broncoalveolar complementam muitas vezes os exames histopatológicos, mas não os substituem. O documento GD 39 (2) contém orientações sobre a realização da lavagem pulmonar.

EXAME OFTALMOLÓGICO

40. Recorrendo a um oftalmoscópio ou a dispositivo equivalente, efetua-se um exame oftalmológico do fundo do olho, dos meios refrativos, da íris e da conjuntiva de cada animal antes de administrar o produto químico em estudo e, no termo do estudo, aos animais do grupo com a concentração mais elevada e dos grupos de controlo. Caso sejam detetadas alterações oculares, devem examinar-se os animais dos outros grupos, incluindo o grupo satélite (para apreciação da reversibilidade).

MACROPATOLOGIA E PESO DO ÓRGÃOS

41. Os animais utilizados nos ensaios (incluindo os que morrerem durante o ensaio ou que forem eutanasiados e retirados do estudo por razões de bem-estar animal) devem ser completamente sangrados (se possível) e sujeitos a uma autópsia macroscópica. Deve registar-se o lapso de tempo entre o termo da última exposição de cada animal e o momento em que o animal é eutanasiado. Se não for possível realizar a autópsia imediatamente depois de detetada a morte do animal, este deve ser refrigerado (não congelado) a uma temperatura suficientemente baixa para minimizar a autólise. As autópsias devem ser efetuadas o mais rapidamente possível, normalmente não mais de um ou dois dias após a morte. Registam-se todas as alterações patológicas macroscópicas de cada animal, prestando especial atenção às alterações do aparelho respiratório.

42. Enumeram-se no quadro 2 os órgãos e tecidos a conservar num meio adequado, durante a autópsia macroscópica, para os exames histopatológicos. A preservação dos órgãos e tecidos indicados entre parênteses retos e de quaisquer outros não indicados fica ao critério do diretor do estudo. Os órgãos indicados a **negrito** devem ser separados dos tecidos aderentes e pesados ainda húmidos o mais rapidamente possível depois da dissecação, para evitar que sequem. A tiroide e os epidídimos só devem pesar-se se for necessário, porque os instrumentos utilizados para separar os tecidos aderentes podem comprometer a avaliação histopatológica. Logo depois da autópsia, fixam-se os tecidos e órgãos em formalina a 10 % tamponada ou com outro fixador adequado. A remoção dos tecidos aderentes só deve realizar-se 24 a 48 horas depois, consoante o fixador utilizado.

▼M4

Quadro 2

Órgãos e tecidos a conservar durante a autópsia macroscópica

Glândulas suprarrenais	[Bolbo olfativo]
Aorta	**Ovários**
Medula óssea (e/ou uma punção recente)	Pâncreas
Encéfalo (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/protuberância anelar)	Glândulas paratiroides
Cego	Nervo periférico (ciático ou tibial), de preferência na vizinhança do músculo
Cólon	Hipófise
Duodeno	Próstata
[**Epidídimos**]	Reto
[Olhos (retina, nervo ótico) e pálpebras]	Glândulas salivares
Fémur e articulação rotular	Vesículas seminais
Vesícula biliar (se presente)	Pele
[Glândulas de Harder]	Medula espinal (cervical, mediotorácica e lombar)
Coração	**Baço**
Íleo	Esterno
Jejuno	Estômago
Rins	Dentes
[Glândulas lacrimais (extraorbitais]	**Testículos**
Laringe (secção em três níveis, incluindo a base da epiglote)	**Timo**
Fígado	**Tiroide**
Pulmões (secção de cada lobo a um só nível, incluindo os brônquios principais)	[Língua]
Gânglios linfáticos da região hilar dos pulmões, especialmente no caso de produtos químicos pouco solúveis que se apresentem sob a forma de partículas. Para exames e/ou estudos mais aprofundados de cariz imunológico, podem conservar-se outros gânglios linfáticos, nomeadamente os das regiões mediastinal, cervical/submandibular e/ou auricular.	Traqueia (secção pelo menos em dois níveis, incluindo uma secção longitudinal na carina e uma secção transversal)
Gânglios linfáticos (distais relativamente à porta de entrada)	[Ureteres]
Glândulas mamárias (nas fêmeas)	[Uretra]
Músculo (coxa)	[Bexiga urinária]
Tecidos nasofaríngeos (secção pelo menos em quatro níveis, um dos quais compreendendo o canal nasofaríngeo e os tecidos linfáticos associados à mucosa nasal — "*nasal associated lymphoid tissue*", NALT).Esófago	**Útero** Órgãos-alvo Todas as massas e lesões macroscópicas

▼M4

43. Removem-se os pulmões intactos, pesam-se e instila-se-lhes um fixador adequado, à pressão de 20 a 30 cm de coluna de água, para conservar a estrutura pulmonar (5) Secciona-se cada lobo a um só nível (incluindo os brônquios principais); caso se proceda a lavagem pulmonar, secciona-se o lobo não lavado em três níveis (não sequenciais).

44. Examinam-se pelo menos quatro níveis dos tecidos nasofaríngeos, um dos quais deve compreender o canal nasofaríngeo (5)(6)(7)(8)(9), para possibilitar um exame adequado do epitélio escamoso, de transição (respiratório não ciliado), respiratório (respiratório ciliado) e olfativo, assim como o tecido linfático adjacente — NALT (10)(11). Examinam-se três níveis da laringe, um dos quais deve incluir a base da epiglote (12). Examinam-se pelo menos dois níveis da traqueia, incluindo uma secção longitudinal na carina da bifurcação que dá origem aos brônquios extrapulmonares e uma secção transversal.

HISTOPATOLOGIA

45. Deve efetuar-se uma avaliação histopatológica dos órgãos e tecidos indicados no quadro 2 a cada animal do grupo com a concentração mais elevada e dos grupos de controlo, bem como aos animais que morrerem ou forem eutanasiados durante o estudo. Deve prestar-se especial atenção ao aparelho respiratório, aos órgãos-alvo e às lesões macroscópicas. Os órgãos e tecidos que apresentem lesões nos animais do grupo com a concentração mais elevada devem ser examinados em todos os grupos. Fica ao critério do diretor do estudo efetuar avaliações histopatológicas a outros grupos, para evidenciar uma resposta clara à concentração. Caso se tenha constituído um grupo satélite de animais (para apreciação da reversibilidade), deve efetuar-se o exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos outros grupos expostos. Se o número de mortes prematuras ou outros problemas no grupo com a concentração mais elevada for excessivo, a ponto de comprometer a significância dos dados, efetua-se um exame histopatológico dos animais expostos ao nível de concentração imediatamente inferior. Deve procurar-se estabelecer correlações entre as observações macroscópicas e os resultados dos exames microscópicos.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

46. Devem apresentar-se dados por animal relativos a peso corporal, consumo alimentar, patologias clínicas, macropatologias, peso dos órgãos e histopatologias. Devem resumir-se os resultados dos exames clínicos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentaram sinais específicos de toxicidade, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados e o momento da morte de cada animal, complementados por uma descrição dos efeitos tóxicos e da evolução e reversibilidade destes, bem como pelos resultados das autópsias. Os resultados, quantitativos ou descritivos, devem ser avaliados por um método estatístico adequado. Os métodos estatísticos devem ser escolhidos no planeamento do estudo, podendo sê-lo qualquer método estatístico corrente adequado.

Relatório dos ensaios

47. Elementos a constar, quando pertinente, do relatório dos ensaios:

Animais estudados e condições em que são mantidos

— descrição das condições de engaiolamento, nomeadamente: número (ou alteração do número) de animais por gaiola, camas, temperatura e humidade relativa ambientes, fotoperíodo e dieta,

▼M4

— espécie e estirpe utilizadas e, caso não sejam utilizados ratos, justificação da utilização de outra espécie. Podem apresentar-se dados originários da proveniência dos animais ou dados históricos, desde que correspondentes a animais sujeitos às mesmas condições de exposição, alojamento e jejum,

— número, idade e sexo,

— método de aleatorização,

— descrição de eventuais condicionamentos anteriores ao ensaio, nomeadamente ao nível da dieta, de quarentenas e do tratamento de doenças.

Produto químico em estudo

— natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas pertinentes (incluindo a isomerização),

— dados de identificação e, se for conhecido, número de registo CAS (*Chemical Abstract Service*).

Veículo

— justificação da utilização e da escolha do veículo (se não for água),

— dados históricos ou paralelos demonstrativos de que o veículo não interfere nos resultados do estudo.

Câmaras de inalação

— descrição pormenorizada – incluindo o volume e um esquema – das câmaras de inalação,

— origem e descrição do equipamento utilizado na exposição dos animais e na geração da atmosfera,

— equipamento de medição da temperatura, humidade, granulometria e concentração real,

— fonte de ar e sistema de climatização utilizado,

— métodos utilizados para calibrar o equipamento a fim de garantir a homogeneidade da atmosfera ensaiada,

— subpressão ou sobrepressão,

— pontos de exposição por câmara (de exposição unicamente nasal); localização dos animais na câmara (câmara de exposição de corpo inteiro),

— estabilidade da atmosfera ensaiada,

— localização nas câmaras dos sensores térmicos e higrométricos e dos pontos de colheita de amostras da atmosfera ensaiada,

— tratamento do ar fornecido/evacuado,

— caudais de ar, caudal de ar em cada ponto de exposição (exposição unicamente nasal) ou relação entre o volume ocupado pelos animais e o volume da câmara (câmara de exposição de corpo inteiro),

— tempo necessário para as câmaras de inalação atingirem o equilíbrio (t95),

— número horário de substituições de volume,

— medidores (se existirem).

Elementos relativos à exposição

— fundamentação da escolha da concentração visada no estudo principal,

▼M4

— concentrações nominais (dadas pela divisão da massa do produto químico em estudo introduzido na câmara de inalação pelo volume de ar total que nela circulou),

— concentrações reais do produto químico em estudo obtidas na zona de respiração dos animais; no caso das misturas que geram formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerossóis), pode analisar-se separadamente cada uma delas,

— as concentrações no ar devem indicar-se em unidades de massa (mg/l, mg/m^3, etc.) e não de volume (ppm, ppb, etc.),

— distribuição granulométrica, diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) e desvio-padrão geométrico (σ_g), incluindo os métodos de cálculo correspondentes; indicar também o resultado de cada análise granulométrica efetuada.

Condições de realização dos ensaios

— elementos sobre a preparação do produto químico estudado, nomeadamente sobre eventuais métodos de redução da granulometria de sólidos ou de preparação de soluções do produto químico,

— descrição (de preferência complementada por um esquema) do equipamento utilizado para gerar a atmosfera ensaiada e para expor os animais a essa atmosfera,

— elementos relativos ao equipamento de monitorização da temperatura, humidade e caudal de ar nas câmaras (curvas de calibração),

— elementos relativos ao equipamento utilizado para colher as amostras para determinação da granulometria e da concentração nas câmaras,

— elementos sobre o método de análise química utilizado e sobre a validação desse método (incluindo o rendimento da recuperação do produto químico em estudo do meio amostrado),

— método utilizado para distribuir aleatoriamente os animais pelos grupos ensaiados e pelos grupos de controlo,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— fundamentação da escolha das concentrações utilizadas nos ensaios.

Resultados

— quadro com a temperatura, a humidade e o caudal de ar nas câmaras,

— quadro com as concentrações nominais e reais nas câmaras,

— quadro com os dados granulométricos, nomeadamente dados analíticos sobre a colheita de amostras, a distribuição granulométrica e os cálculos de MMAD e σ_g,

— quadro com os dados de resposta e as concentrações correspondentes a cada animal (animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, e natureza, intensidade, momento do aparecimento e duração dos efeitos),

▼M4

— quadro com os pesos de cada animal,

— quadro dos consumos alimentares,

— quadro dos dados de patologia clínica,

— resultados da autópsia e resultados histopatológicos correspondentes a cada animal, se disponíveis.

Discussão e interpretação dos resultados

— deve ser dada especial atenção à descrição dos métodos utilizados para satisfazer os critérios deste método de ensaio, nomeadamente no que respeita à concentração-limite e à granulometria,

— examinar em que medida, com base nos resultados globais, as partículas são respiráveis, em especial se os critérios granulométricos não forem satisfeitos,

— a apreciação global do estudo deve incidir igualmente na coerência dos métodos utilizados para determinar as concentrações nominal e real e deve dar conta da relação entre estas concentrações,

— referir a causa provável da morte e o modo de ação predominante (sistémico ou local),

— explicar por que razão terá sido necessário eutanasiar animais que apresentavam sinais de dor ou de grande sofrimento continuado, com base nos critérios do documento de orientações da OCDE relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (3);

— identificar o(s) órgão(s)-alvo,

— determinar o NOAEL e o LOAEL (nível mínimo com observação de efeitos adversos).

REFERÊNCIAS:

(1) OCDE (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*. Original Test Guideline No. 413. Environment Directorate, OCDE, Paris.

(2) OCDE (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing.* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

(4) Whalan J.E., Redden J.C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Capítulo 9), *in Toxicology of Inhaled Material*. Witschi, H.P., Brain, J.D. (eds.). Springer Verlag Heidelberg, p. 229-258.

(6) Young J.T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1:309-312.

(7) Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ. Health Perspect.* 85:231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. *In* Waalkes M.P., Ward J.M. (eds.) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22:353-372.

(10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13:219-224.

(11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141:281-285.

(12) Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3):419-428.

(13) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

Apêndice 1

DEFINIÇÃO

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M4

B.30. ESTUDOS DE TOXICIDADE CRÓNICA

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 452 (2009) da OCDE. O *Test Guideline* 452 (TG 452) inicial foi adotado em 1981. Entendeu-se necessário rever o método B.30 para dar conta da evolução recente no domínio do bem-estar animal e da regulamentação (1)(2)(3)(4). A atualização do método B.30 decorreu paralelamente à revisão dos capítulos B.32 ("Estudos de carcinogenicidade") e B.33 ("Estudos combinados de toxicidade crónica e carcinogenicidade") deste anexo. Visa-se obter mais dados a partir dos animais utilizados nos estudos e dispor de mais elementos para a escolha das doses. Este método foi concebido para o ensaio de uma vasta gama de produtos químicos, nomeadamente pesticidas e produtos químicos industriais.

2. Na sua maioria, os estudos de toxicidade crónica são efetuados em roedores. Este método destina-se, portanto, a ser aplicado, preferencialmente, a estudos em espécies de roedores. Caso seja necessário efetuar estudos noutras espécies, os princípios e procedimentos descritos neste método e no capítulo B.27 deste anexo — "Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias" (5) — podem igualmente ser aplicados, com as adaptações necessárias descritas no *Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (n.º 116) da OCDE (6).

3. As três vias principais de administração nos estudos de toxicidade crónica são a via oral, a via dérmica e a via inalatória. A via de administração escolhida depende das características físico-químicas do produto químico em estudo e da via predominante de exposição humana. O documento de orientações n.º 116 da OCDE (6) contém mais informações sobre a escolha da via de exposição.

4. Este método centra-se na exposição por via oral, que é a via habitualmente mais utilizada nos estudos de toxicidade crónica. Embora possa também ser necessário efetuar estudos de toxicidade crónica a longo prazo por via dérmica ou por inalação para avaliar o risco para a saúde humana e/ou isso possa mesmo ser exigido pela regulamentação aplicável, estas duas vias de exposição são bastante complexas do ponto de vista técnico e esses estudos têm de ser concebidos para cada caso concreto. Porém, no que diz respeito às recomendações relativas aos períodos de exposição, aos parâmetros clínicos e patológicos e a outros aspetos, o método aqui descrito para caracterização e avaliação da toxicidade crónica por administração oral pode constituir a base de um protocolo para estudos por inalação e/ou por via dérmica. A OCDE publicou orientações relativas ao estudo da administração de produtos químicos por inalação (6)(7) e por via dérmica (6). Para a conceção de estudos a longo prazo com exposição por via inalatória, recomenda-se especificamente a consulta dos capítulos B.8 (8) e B.29 (9) deste anexo e do documento de orientações da OCDE relativo a ensaios de toxicidade aguda por inalação (7). No caso dos ensaios por via dérmica, deve consultar-se o capítulo B.9 (10) deste anexo.

▼M4

5. Os estudos de toxicidade crónica fornecem informações sobre os perigos para a saúde que potencialmente podem advir da exposição repetida durante um período considerável do tempo de vida da espécie utilizada. Estes estudos fornecem informações sobre os efeitos tóxicos do produto químico em causa, os órgãos afetados e a possibilidade de acumulação. Podem igualmente servir para obter uma estimativa do nível sem observação de efeitos adversos ("*no observed adverse effect level*", NOAEL), com base na qual se podem estabelecer critérios de segurança para a exposição humana. Salienta-se a necessidade de um exame clínico cuidadoso dos animais, de modo a obter-se o máximo de informação possível.

6. Entre os objetivos dos estudos efetuados por este método contam-se os seguintes:

— identificação da toxicidade crónica de produtos químicos,

— identificação de órgãos afetados,

— caracterização de relações dose-resposta,

— determinação de níveis sem observação de efeitos adversos (NOAEL) ou ponto de partida para o estabelecimento de doses de referência,

— previsão de efeitos de toxicidade crónica aos níveis da exposição humana,

— obtenção de dados para verificação de hipóteses relativas a modos de ação (6).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. Antes de efetuar um estudo com vista à caracterização e avaliação de um produto químico do ponto de vista toxicológico, o laboratório que efetuará os ensaios deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa, a fim de adaptar o estudo de modo a melhorar a eficiência da determinação do potencial de toxicidade crónica e para minimizar o recurso a animais. Entre os elementos que podem ser úteis na conceção do estudo contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em causa, informações disponíveis sobre o modo de ação, resultados de ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana, dados (Q)SAR — "*(quantitative) structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins, dados toxicocinéticos disponíveis (dados cinéticos associados a uma dose única ou a doses múltiplas) e dados provenientes de outros estudos com exposição repetida. Só deve proceder-se à determinação da toxicidade crónica depois de obtidos dados de toxicidade preliminares provenientes de estudos de toxicidade com repetição da dose administrada durante 28 e/ou 90 dias. Deve ponderar-se uma abordagem faseada dos ensaios de toxicidade crónica no âmbito da avaliação global dos potenciais efeitos adversos na saúde do produto químico em estudo (11)(12)(13)(14).

8. Antes de iniciar o estudo, devem escolher-se, com base no plano experimental e nos objetivos estabelecidos, os métodos estatísticos mais adequados para a análise dos resultados. Entre outros aspetos a considerar, é necessário determinar se o tratamento estatístico deverá contemplar ajustamentos em função do grau de sobrevivência e que tipo de análise deve efetuar-se no caso da morte prematura de todos os animais de um ou mais grupos. Para orientações sobre as análises estatísticas mais adequadas e informação sobre as referências bibliográficas fundamentais dos métodos estatísticos internacionalmente reconhecidos, deve consultar-se o documento de orientações n.º 116 (6), assim como o documento de orientações n.º 35, relativo à análise e avaliação de estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (15).

▼M4

9. Ao realizar um estudo de toxicidade crónica, recomenda-se que sejam sempre seguidos os princípios e considerações orientadoras enunciados no *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (n.º 19) da OCDE (16), nomeadamente os expressos no ponto 62 do mesmo, cuja tradução é a seguinte: *Nos estudos com repetição da dose administrada, se um animal evidenciar sinais clínicos progressivos da deterioração do seu estado, deve tomar-se uma decisão com conhecimento de causa sobre se deve ou não ser eutanasiado. Para isso, deve ponderar-se, nomeadamente, o valor das informações que seriam obtidas no caso de o animal continuar integrado no estudo, relativamente ao estado geral do mesmo. Caso se decida manter o animal no estudo, deve aumentar-se, tanto quanto necessário, a frequência dos exames que lhe são efetuados. Também é possível, sem prejudicar a finalidade do ensaio, suspender temporariamente a administração do produto químico em estudo — se isso reduzir a dor ou o sofrimento do animal — ou reduzir a dose administrada.*

10. Para orientações pormenorizadas sobre os princípios aplicáveis à escolha das doses para estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade e uma discussão dos mesmos, recomenda-se a consulta do documento de orientações n.º 116 (6) e das publicações com as referências 17 e 18 do International Life Sciences Institute. A estratégia de base para escolha das doses depende do objetivo ou objetivos principais do estudo (ver o ponto 6). Para escolher doses adequadas, importa estabelecer um equilíbrio entre, por um lado, a identificação dos perigos em jogo e, por outro, a caracterização e importância das respostas às doses reduzidas. Este equilíbrio é especialmente necessário quando se realizam estudos combinados de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo) — ver o ponto 11.

11. Deve ponderar-se a oportunidade de efetuar um estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo), em vez de efetuar separadamente um estudo de toxicidade crónica (o presente método B.30) e um estudo de carcinogenicidade (capítulo B.32 deste anexo). O estudo combinado é mais favorável, em termos de tempo e de custos, do que dois estudos distintos e não prejudica a qualidade dos dados obtidos na etapa de toxicidade crónica nem na etapa de carcinogenicidade. Ao efetuar um estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo), é, porém, necessário prestar especial atenção aos princípios relativos à escolha das doses (pontos 9 e 20 a 25). Reconhece-se, porém, que determinadas regulamentações podem exigir a realização de estudos separados.

12. No final do capítulo e no documento de orientações n.º 116 (6) definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

13. Administra-se diariamente o produto químico em estudo a vários grupos de animais, em doses crescentes de grupo para grupo, normalmente durante doze meses, embora possam escolher-se períodos mais longos ou mais curtos em função das exigências da regulamentação (ver o ponto 33). Escolhe-se a duração do estudo de modo a ser suficientemente longa para que os eventuais efeitos de toxicidade acumulada se manifestem, mas sem que sejam perturbados por alterações ligadas ao envelhecimento dos animais. Se o período de exposição não for de doze meses, é necessário fundamentá-lo, sobretudo se a duração da exposição for mais curta. Normalmente, administra-se o produto químico por via oral, embora a via inalatória ou a via dérmica também possam ser adequadas. Pode estar prevista a realização de uma ou mais eutanásias intercalares, por exemplo, após três ou seis meses. Nesse caso, pode aumentar-se o número de grupos de animais em conformidade (ver o ponto 19). No decurso do período de administração do produto químico, deve verificar-se atentamente se os animais evidenciam sinais de toxicidade. Autopsia-se os animais que morrem ou são eutanasiados durante os ensaios. No final dos ensaios, eutanasiam-se e autopsia-se os animais sobreviventes.

▼M4

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

14. Este método trata, em especial, da caracterização e avaliação da toxicidade crónica em roedores (ver o ponto 2), embora determinadas regulamentações exijam estudos similares em não roedores. É necessário justificar a escolha da espécie. Se forem exigidos estudos de toxicidade crónica em espécies que não sejam de roedores, a conceção e realização desses estudos deve basear-se nos princípios descritos no presente método e no capítulo B.27 deste anexo – "Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias" (5). O documento de orientações n.º 116 (6) contém mais informações sobre a escolha da espécie e da estirpe.

15. Embora neste método se possa recorrer a outros roedores, como o ratinho, a espécie preferida é o rato. O rato e o ratinho constituem os modelos experimentais preferidos devido à sua longevidade relativamente reduzida, à sua utilização generalizada em estudos farmacológicos e toxicológicos, à sua sensibilidade à indução de tumores e à disponibilidade de estirpes suficientemente caracterizadas destas espécies. Em consequência disto, dispõe-se de numerosos dados sobre a fisiologia e patologia destes animais. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. O estudo de toxicidade crónica deve ser realizado com animais da mesma estirpe e proveniência que os utilizados no estudo ou estudos preliminares mais curtos. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas.

Condições de alojamento e alimentação

16. Os animais podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo. É necessário justificar cientificamente a opção pelo alojamento individual (19)(20)(21). As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 30 %, no mínimo, e um valor máximo que, preferencialmente, não deve exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições. A dieta deve satisfazer as necessidades nutricionais da espécie estudada. Os teores de contaminantes da dieta – resíduos de pesticidas, poluentes orgânicos persistentes, fitoestrogénios, metais pesados, micotoxinas e outros – podem influenciar os resultados dos ensaios e devem ser os mais baixos possíveis. É necessário obter periodicamente dados analíticos relativos aos teores de nutrientes e de contaminantes da dieta, pelo menos no início do estudo e quando se muda de lote. Estes dados devem constar do relatório final. É igualmente necessário dispor de dados analíticos da água de beber utilizada no estudo. Quando o produto químico em estudo é administrado por via alimentar, a escolha da dieta pode ser influenciada pela necessidade de nela misturar convenientemente esse produto químico e de satisfazer simultaneamente as exigências nutricionais dos animais.

Preparação dos animais

17. Os animais utilizados devem ser saudáveis e ter sido aclimatados às condições laboratoriais durante, pelo menos, sete dias e não devem ter participado em experiências anteriores. No caso dos roedores, a administração do produto químico em estudo deve iniciar-se logo que possível após o desmame e a aclimatação, de preferência antes de os animais completarem oito semanas. É necessário caracterizar a espécie, a estirpe, a proveniência, o sexo, o peso e a idade dos animais utilizados no estudo. No início do estudo, as diferenças de peso entre os animais de cada sexo devem ser mínimas, não se

▼M4

desviando mais de 20 % do peso médio de todos os animais de cada sexo nele utilizados. Distribuem-se aleatoriamente os animais pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. Depois da distribuição aleatória dos animais, a média de peso corporal não deve diferir significativamente de grupo para grupo de animais do mesmo sexo. Se houver diferenças com significado estatístico, os animais devem, se possível, ser redistribuídos aleatoriamente. Deve atribuir-se a cada animal um número de identificação único, com o qual o animal seja identificado por tatuagem, implantação de *microchip* ou outro método adequado.

PROCEDIMENTO

Número e sexo dos animais

18. Devem ser utilizados animais de ambos os sexos. O número de animais utilizados deve ser suficiente para que, no final do estudo, reste em cada grupo um número de animais que permita efetuar uma avaliação biológica e estatística aprofundada. Caso se utilizem roedores, normalmente cada grupo do mesmo sexo exposto a cada dose deve integrar, pelo menos, 20 animais; caso não se utilizem roedores, recomenda-se que o número mínimo seja de quatro animais do mesmo sexo por grupo, para cada dose. Nos estudos em ratinhos, pode ser necessário reforçar o número de animais em cada grupo, para cada dose, para poder realizar todas as determinações hematológicas previstas.

Eutanásias intercalares, grupos satélites e animais sentinelas

19. Caso se justifique do ponto de vista científico, pode prever-se a realização de eutanásias intercalares (pelo menos dez animais de cada grupo, de cada um dos sexos), por exemplo, ao fim de seis meses, para obter informações sobre a evolução das alterações toxicológicas, bem como dados mecanísticos. Caso já se disponha desses dados, obtidos em estudos de toxicidade por dose repetida realizados com o produto químico em causa, as eutanásias em questão podem não se justificar cientificamente. Podem também prever-se grupos satélites para verificar a reversibilidade de alterações toxicológicas induzidas pelo produto químico em estudo. Nesse caso, os grupos satélites restringir-se-ão, normalmente, à dose mais elevada em estudo e aos grupos de controlo. Pode ainda prever-se um grupo de animais sentinelas (habitualmente cinco animais de cada sexo) para verificar, se necessário, o aparecimento de doenças durante o estudo (22). Caso esteja prevista a realização de eutanásias intercalares ou a inclusão de grupos satélites ou sentinelas, o número de animais a utilizar no estudo deve ser aumentado no número de animais a eutanasiar antes do termo do mesmo. Normalmente, os animais em causa devem ser objeto dos mesmos exames, nomeadamente peso corporal, consumo de alimentos e de água, análises hematológicas e de química clínica e exames patológicos, que os animais participantes na etapa de toxicidade crónica do estudo principal, embora também possa prever-se (no caso dos grupos com destino a eutanásia intercalar) que as determinações se limitem a parâmetros fundamentais específicos, por exemplo, de neurotoxicidade ou de imunotoxicidade.

Grupos de dose e dosagens

20. O documento de orientações n.º 116 (6) contém orientações relativas a todos os aspetos relacionados com a escolha das doses e os intervalos entre estas. Devem ser utilizados, pelo menos, três doses e um controlo em paralelo, exceto nos casos em que se realiza um ensaio do limite (ver o ponto 27). As doses baseiam-se, normalmente, nos resultados de estudos exploratórios das doses ou de estudos de dose repetida por períodos mais curtos e devem atender aos dados toxicológicos e toxicocinéticos disponíveis sobre o produto químico em estudo ou produtos químicos afins.

▼M4

21. A menos que tal dose esteja limitada pelas características físico-químicas ou pelos efeitos biológicos do produto químico em estudo, normalmente escolhe-se para dose mais elevada o nível que permita identificar os principais órgãos afetados e os efeitos tóxicos principais sem causar sofrimento, efeitos tóxicos intensos, morbidez nem mortalidade. Tendo presente o referido no ponto 22, deve escolher-se para dose mais elevada uma dose que induza efeitos tóxicos, evidenciados, por exemplo, por uma redução (aproximadamente de 10 %) do ganho de peso corporal.

22. Todavia, consoante os objetivos do estudo (ver o ponto 6), pode escolher-se uma dose máxima inferior à que evidencia efeitos tóxicos, por exemplo, se essa dose induzir um efeito adverso preocupante, mas com pouca influência na longevidade ou no peso corporal dos animais. A dose máxima não deve exceder 1 000 mg por quilograma de peso corporal por dia (relativamente à dose-limite, ver o ponto 27).

23. Podem escolher-se doses e intervalos entre doses que permitam estabelecer uma relação dose-resposta e determinar um NOAEL ou outro resultado pretendido do estudo, por exemplo, uma dose de referência (ver o ponto 25) ao nível de dose mais baixo. Entre os fatores a ter em conta na escolha das doses mais baixas, contam-se o declive esperado da curva dose-resposta, as doses às quais podem ocorrer alterações importantes ao nível metabólico ou do modo da ação tóxica, o nível ao qual se prevê a ocorrência de um limiar e o nível ao qual se prevê fixar o ponto de partida de extrapolações para doses mais baixas.

24. O intervalo entre as doses depende das características do produto químico em estudo e não pode ser prescrito neste método. Contudo, a utilização de intervalos definidos por um fator de 2 a 4 entre doses consecutivas dá frequentemente bons resultados nestes ensaios, sendo muitas vezes melhor ensaiar um quarto grupo do que recorrer a intervalos muito grandes (por exemplo, mais do que um fator de 6 a 10) entre as dosagens. Em geral, são de evitar fatores superiores a 10. Caso contrário, é necessário justificá-los.

25. Conforme se explica mais em pormenor no documento de orientações n.º 116 (6), entre os aspetos a ter em conta na escolha das doses contam-se os seguintes:

— relações não lineares ou pontos de inflexão conhecidos ou de que se suspeite na curva dose-resposta,

— aspetos toxicocinéticos e doses às quais ocorra, ou não ocorra, indução metabólica, saturação ou não linearidade entre as doses externas e as doses internas,

— lesões precursoras, marcadores de efeitos ou indicadores de processos biológicos fundamentais subjacentes em curso,

— aspetos fundamentais (ou de que se suspeite) do modo de ação, tais como as doses às quais começam a manifestar-se efeitos citotóxicos, os níveis hormonais são perturbados, os mecanismos homeostáticos colapsam, etc.,

— regiões da curva dose-resposta que necessitam de estimativas especialmente rigorosas, por exemplo, perto da dose de referência prevista ou da dose à qual se suspeite corresponder um limiar,

— níveis previstos de exposição humana.

▼M4

26. O grupo de controlo deve ser um grupo não exposto ao produto químico em estudo ou, se for usado um veículo para administrar o produto químico, um grupo de controlo do veículo. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos ensaiados. Caso se utilize um veículo, o grupo de controlo deve receber o volume máximo de veículo utilizado nos grupos expostos ao produto químico em estudo. Se o produto químico for administrado por via da dieta e reduzir significativamente a quantidade desta ingerida por lhe conferir menor palatabilidade, um grupo de controlo adicional alimentado do mesmo modo, em paralelo, pode constituir um grupo de controlo mais adaptado.

27. Se, com base em estudos preliminares, for de prever que o ensaio, realizado de acordo com o presente método, de uma dose equivalente a não menos de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia não provoque efeitos adversos e, tendo em conta dados referentes a produtos químicos estruturalmente afins, não forem de prever efeitos tóxicos, pode considerar-se que não é necessário efetuar um estudo completo com três doses. Nesses casos, pode justificar-se um limite de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia, exceto se os dados relativos à exposição humana aconselharem o ensaio de doses superiores.

Preparação das doses e administração do produto químico em estudo

28. O produto químico em estudo é normalmente administrado por via oral, através da dieta ou da água de beber ou por intermédio de uma sonda esofágica. O documento de orientações n.º 116 (6) contém mais informações sobre vias e métodos de administração. A via e o método de administração dependem do objetivo do estudo, bem como das propriedades físico-químicas e biodisponibilidade do produto químico em causa e da via e do método de exposição humana predominantes. É necessário fundamentar a via e o método de administração escolhidos. Por razões de bem-estar animal, normalmente só deve optar-se pela utilização de uma sonda esofágica no caso dos agentes relativamente aos quais a via oral e este método de administração representem razoavelmente a exposição humana potencial (por exemplo, através da ingestão de produtos farmacêuticos). No caso dos produtos químicos ingeridos com os alimentos ou disseminados no ambiente, nomeadamente pesticidas, a administração habitual é por incorporação na dieta ou na água de beber. Todavia, para outros cenários — caso da exposição profissional —, pode justificar-se a administração por outras vias.

29. Se necessário, pode suspender-se ou dissolver-se o produto químico em estudo num veículo apropriado. Devem ser tidos em conta as seguintes características que se justifiquem do veículo e de outros aditivos: efeitos na absorção, na distribuição, no metabolismo ou na retenção do produto químico em estudo, efeitos nas propriedades químicas do produto químico em causa suscetíveis de alterarem as características tóxicas do mesmo e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais. Recomenda-se que, sempre que possível, a primeira opção seja uma solução ou suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode optar-se por uma solução ou emulsão num óleo (por exemplo, em óleo de milho); em último caso, poderá recorrer-se a uma solução noutro veículo. Se o veículo utilizado não for água, é necessário conhecer as suas características de toxicidade. Deve dispor-se de informações sobre a estabilidade do produto químico em estudo e a homogeneidade das soluções ou rações de dosagem (consoante o caso) nas condições de administração (por exemplo, por via da dieta).

30. É importante assegurar que a quantidade de um produto químico em estudo administrada através da dieta ou da água de beber não interfere nas exigências normais de nutrição nem no equilíbrio hídrico. No caso dos estudos de toxicidade a longo prazo nos quais o produto químico seja administrado pela via alimentar, a concentração deste nos alimentos não deve, normalmente, exceder 5 % da ração total, a fim de evitar desequilíbrios nutricionais. Se o produto químico em estudo for administrado por via da dieta, pode optar-se por concentrações constantes nesta (mg/kg de alimentos ou ppm) ou por doses constantes em relação ao peso corporal do animal (mg/kg de peso corporal), calculadas semanalmente. Deve indicar-se a opção tomada.

▼M4

31. Em caso de administração por via oral, os animais recebem uma dose quotidiana (sete dias por semana) do produto químico em estudo, normalmente durante doze meses (ver também o ponto 33), embora possa ser necessário um período mais longo, em função das exigências da regulamentação. É necessário justificar qualquer outro regime de dosagem (por exemplo, cinco dias por semana). Em caso de administração por via dérmica, os animais são normalmente expostos ao produto químico em estudo durante, pelo menos, seis horas por dia, sete dias por semana, conforme se descreve no capítulo B.9 (10) deste anexo, ao longo de doze meses. A exposição por via inalatória é efetuada durante seis horas por dia, sete dias por semana. Todavia, caso se justifique, também podem expor-se os animais durante cinco dias por semana. O período de exposição neste caso é normalmente de doze meses. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Se a duração da exposição for inferior a seis horas por dia, é necessário fundamentá-lo. Ver também o capítulo B.8 (8) deste anexo.

32. A administração do produto químico aos animais por meio de uma sonda esofágica deve efetuar-se à mesma hora do dia por meio de um tubo estomacal ou de uma cânula de intubação adequada. Normalmente, administra-se a dose diária de uma só vez. Porém, se o produto químico for, por exemplo, um irritante local, pode repartir-se a mesma dose diária por dois momentos. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal e deve ser o mínimo possível. No caso dos roedores, normalmente não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal (22). Para minimizar diferenças entre volumes administrados, devem ser efetuados ajustes nas concentrações, de forma que o volume seja o mesmo para todas as doses. Excetuam-se os produtos químicos potencialmente corrosivos ou irritantes, que têm de ser diluídos para evitar efeitos locais intensos. Devem evitar-se concentrações que possam provocar efeitos corrosivos ou irritantes no tubo digestivo.

Duração do estudo

33. Embora este método tenha sido preferencialmente concebido para estudos de toxicidade crónica com a duração de doze meses, também está adaptado e pode aplicar-se a estudos mais curtos (por exemplo, 6 ou 9 meses) ou mais longos (por exemplo, 18 ou 24 meses), consoante o exija a regulamentação pertinente ou por razões mecanísticas determinadas. Se o período de exposição não for de doze meses, é necessário fundamentá-lo, sobretudo se a duração da exposição for mais curta. Os grupos satélites incluídos para verificar a reversibilidade de alterações toxicológicas induzidas pelo produto químico em estudo devem manter-se sem dosagem após o termo da exposição, durante um período não inferior a quatro semanas e não superior a um terço da duração total do estudo. O documento de orientações n.º 116 (6) contém mais orientações, nomeadamente em matéria de sobrevivência dos animais no estudo.

EXAMES

34. Normalmente no início e no final de cada dia, incluindo fins de semana e feriados, devem verificar-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais. Pelo menos uma vez por dia, deve efetuar-se um exame clínico geral, de preferência sempre à(s) mesma(s) hora(s) e, no caso da administração por sonda esofágica, tendo em conta o período previsto de efeitos mais acentuados após a administração do produto químico.

▼M4

35. Deve efetuar-se um exame clínico aprofundado a cada animal pelo menos uma vez antes da primeira exposição (para poder fazer depois comparações com o estado inicial do animal), no final da primeira semana do estudo e, a partir daí, mensalmente. Os exames devem respeitar um protocolo que minimize as variações entre quem os realiza e não faça depender os resultados do grupo examinado. Estes exames devem ser realizados fora das gaiolas, de preferência num recinto normalizado e sempre à mesma hora. Os resultados destes exames devem ser cuidadosamente registados, de preferência por recurso a um sistema de pontuação claramente definido pelo laboratório em causa. Deve zelar-se por que as condições de exame sejam o mais constantes possível. Entre os sinais a registar contam-se alterações da pele, da pelagem, dos olhos e das mucosas e a ocorrência de secreções, excreções ou reações neurovegetativas (por exemplo, lacrimação, horripilação, alterações da dimensão pupilar ou respiração anormal). Deve também registar-se qualquer alteração da maneira de o animal se mover, da postura e da reação à manipulação, bem como a ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e de comportamentos estereotipados (por exemplo, atos de higiene repetitivos ou movimentação repetitiva em círculo) ou estranhos (automutilação, movimentação para trás, etc.) (24).

36. Recorrendo a um oftalmoscópio ou a dispositivo equivalente, efetua-se um exame oftalmológico a cada animal antes da primeira administração do produto químico em estudo. No termo do estudo, deve efetuar-se este exame de preferência a todos os animais, mas pelo menos aos dos grupos expostos à dose mais elevada e dos grupos de controlo. Se forem detetadas alterações oculares atribuíveis à exposição ao produto químico em estudo, devem examinar-se todos os animais. Se a análise estrutural ou outros elementos indiciarem efeitos tóxicos ao nível ocular, deve aumentar-se a frequência dos exames oculares.

37. No caso dos produtos químicos que tenham revelado potencial de indução de efeitos neurotóxicos em estudos anteriores de toxicidade por dose repetida a 28 dias e/ou a 90 dias, poderá, a título facultativo, verificar-se a reatividade sensorial a diversos tipos de estímulos (24) — por exemplo, estímulos auditivos, visuais ou propriocetivos (25)(26)(27) — e avaliar-se a força de preensão (28) e a atividade motora (29), antes de iniciar o estudo e, a partir daí, de três em três meses, até aos doze meses, inclusive, bem como no termo do estudo (se for além de doze meses). As referências indicadas contêm mais informações sobre a maneira de proceder em cada caso, embora possam adotar-se procedimentos distintos dos nelas descritos.

38. No caso dos produtos químicos que tenham revelado potencial de indução de efeitos imunotóxicos em estudos anteriores de toxicidade por dose repetida a 28 dias e/ou a 90 dias, poderá, a título facultativo, aprofundar-se a investigação deste parâmetro no termo do estudo.

Peso corporal, consumo de alimentos e de água, eficiência alimentar

39. Todos os animais devem ser pesados no início da exposição, pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Deve medir-se o consumo de alimentos e a eficiência alimentar pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, deve medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Pode ser útil medir o consumo de água também no caso dos estudos em que se verifiquem alterações do comportamento dos animais a esse nível.

▼M4

Análises hematológicas e de bioquímica clínica

40. Nos estudos com roedores, devem ser efetuadas análises hematológicas a, pelo menos, dez machos e dez fêmeas de cada grupo, aos três, seis e 12 meses e no termo do estudo (se for além de 12 meses), sempre aos mesmos animais. No caso dos ratinhos, a realização das análises hematológicas necessárias pode exigir o recurso a animais satélites (ver o ponto 18). No caso dos estudos em que não sejam utilizados roedores, colhem-se amostras num número mais reduzido de animais (por exemplo, se a espécie utilizada for o cão, quatro animais de cada sexo, por grupo) em estádios intermédios e no termo do estudo, tal como se indicou para os roedores. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros hematológicos, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses, tanto no caso dos roedores como de outras espécies. As amostras de sangue devem ser colhidas, sob anestesia, num ponto determinado a indicar, por exemplo, por punção cardíaca ou no seio retro-orbital.

41. Devem ser efetuadas as seguintes análises (30): contagem total de leucócitos, fórmula leucocitária, contagem de eritrócitos, contagem de plaquetas, concentração de hemoglobina, hematócrito (volume celular sanguíneo após centrifugação), volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada. Se necessário, em função da toxicidade do produto químico em estudo, poderão analisar-se outros parâmetros hematológicos, tais como os corpos de Heinz e outras anomalias morfológicas dos eritrócitos ou a meta-hemoglobina. Em termos gerais, deve adotar-se uma perspetiva de flexibilidade, dependendo dos efeitos observados e/ou previstos do produto químico em causa. Se este tiver efeitos no sistema hematopoiético, pode ser útil efetuar também a contagem de reticulócitos e uma citologia da medula óssea, embora estas análises não sejam sistematicamente necessárias.

42. Com a cronologia especificada para as análises hematológicas e colhendo as amostras de sangue sempre nos mesmos animais — pelo menos dez machos e dez fêmeas de cada grupo —, devem ser efetuadas análises de bioquímica clínica para determinar os principais efeitos tóxicos nos tecidos, nomeadamente ao nível dos rins e do fígado. No caso dos ratinhos, a realização das necessárias análises de bioquímica clínica pode exigir o recurso a animais satélites. No caso dos estudos em que não sejam utilizados roedores, colhem-se amostras num número mais reduzido de animais (por exemplo, se a espécie utilizada for o cão, quatro animais de cada sexo, por grupo) em estádios intermédios e no termo do estudo, tal como se indicou para os roedores. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros de bioquímica clínica, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses, tanto no caso dos roedores como de outras espécies. Recomenda-se o jejum dos animais (exceto dos ratinhos) durante a noite, antes da colheita das amostras de sangue. Devem ser efetuadas as seguintes análises (30): glucose, ureia (azoto ureico), creatinina, proteínas totais, albumina, cálcio, sódio, potássio, colesterol total, pelo menos duas análises reveladoras de efeitos hepatocelulares (alanina-aminotransferase, aspartato-aminotransferase, glutamato-desidrogenase, ácidos biliares totais) (31) e, pelo menos, duas análises reveladoras de efeitos hepatobiliares (fosfatase alcalina, gama-glutamil-transferase, 5'-nucleotidase, bilirrubina total, ácidos biliares totais) (31). Se necessário, em função da toxicidade do produto químico em estudo, poderão analisar-se outros parâmetros de química clínica, tais como a colinesterase, hormonas específicas e os triglicéridos em jejum. Em termos gerais, deve adotar-se uma perspetiva de flexibilidade, dependendo dos efeitos observados e/ou previstos do produto químico em causa.

▼M4

43. Devem ser efetuadas análises de urina a, pelo menos, dez machos e dez fêmeas de cada grupo, em amostras colhidas com a cronologia especificada para as análises hematológicas e de química clínica. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros analisados na urina, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses. Uma recomendação de peritos relativa a estudos de patologia clínica (30) inclui a seguinte lista de parâmetros: aspeto, volume, osmolalidade ou densidade, pH, proteínas totais e glucose. Podem também determinar-se os seguintes parâmetros: corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e sangue oculto. Pode ser necessário recorrer ainda a outros parâmetros para investigar melhor os efeitos observados.

44. Em geral, considera-se que, nos estudos em cães, é necessário dispor dos valores de base dos parâmetros hematológicos e de bioquímica clínica antes de iniciar a exposição dos animais, o mesmo não sucedendo, porém, no caso dos estudos em roedores (30). Se os dados de base históricos (ver o ponto 50) forem inadequados, pode, no entanto, ser necessário determinar os dados em falta.

Patologia

Autópsia macroscópica

45. Normalmente, deve ser realizada a todos os animais estudados uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Todavia, pode igualmente prever-se que (no caso dos grupos com destino a eutanásia intercalar e dos grupos satélites) as determinações se limitem a parâmetros fundamentais específicos, por exemplo, de neurotoxicidade ou de imunotoxicidade (ver o ponto 19). Não é necessário autopsiar esses animais nem aplicar-lhes os procedimentos descritos nos pontos seguintes. Fica ao critério do diretor do estudo decidir em que casos é necessário autopsiar animais sentinelas.

46. Deve determinar-se o peso dos órgãos de cada animal, com exceção dos excluídos no ponto 45. Removem-se convenientemente todos os tecidos aderentes às glândulas suprarrenais, ao encéfalo, aos epidídimos, ao coração, aos rins, ao fígado, aos ovários, ao baço, aos testículos, à tiroide (com as glândulas paratiroides, sendo a pesagem efetuada depois da fixação) e ao útero de todos os animais (exceto os moribundos e os que sejam eutanasiados durante o estudo) e pesa-se cada um destes ainda húmido o mais rapidamente possível depois da dissecação, para evitar que seque. Nos estudos em ratinhos, a pesagem das glândulas suprarrenais é facultativa.

47. Os tecidos a seguir indicados devem conservar-se no meio de fixação mais adequado ao tipo de tecido em causa e ao exame histopatológico previsto (32) — os tecidos entre parênteses retos são facultativos:

todas as lesões macroscópicas	coração	pâncreas	estômago (pré-estômago, estômago glandular)
glândulas suprarrenais	íleo	glândulas paratiroides	[dentes]
aorta	jejuno	nervo periférico	testículos
encéfalo (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/ /protuberância anelar)	rins	hipófise	timo
cego	glândulas lacrimais (exo--orbitais)	próstata	tiroide
colo do útero	fígado	reto	[língua]

▼M4

glândulas de coagulação	pulmões	glândulas salivares	traqueia
cólon	gânglios linfáticos (superficiais e profundos)	vesículas seminais	bexiga urinária
duodeno	glândulas mamárias (obrigatório no caso das fêmeas e, nos machos, se for claramente dissecável)	músculo esquelético	útero, incluindo o colo do útero
epidídimo	[vias respiratórias superiores, incluindo o nariz, os cornetos e os seios paranasais]	pele	[ureteres]
olhos (incluindo a retina)	esófago	medula espinal (a três níveis: cervical, mediotorácico e lombar)	[uretra]
[fémur com articulação]	[bolbo olfativo]	baço	vagina
vesícula biliar (exceto no caso do rato)	ovários	[esterno]	secção da medula óssea e/ou uma punção recente de medula óssea
glândulas de Harder			

No caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem ser conservados ambos. Os resultados clínicos e outros podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem ser conservados também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indiciem que serão provavelmente afetados. Nos estudos por via dérmica, os órgãos a conservar são ainda os constantes da lista relativa à exposição por via oral, mas é essencial proceder igualmente à amostragem e à conservação de pele do local onde o produto químico em estudo foi aplicado. Nos estudos por inalação, a lista de tecidos do aparelho respiratório a conservar e a examinar deve seguir as recomendações dos capítulos B.8 (8) e B.29 (9) deste anexo. A lista de outros órgãos e tecidos a examinar neste caso (além dos tecidos do aparelho respiratório a conservar já especificados), é a estabelecida para a exposição por via oral.

Histopatologia

48. A referência 32 contém orientações sobre as melhores práticas a seguir na realização de estudos de patologias toxicológicas. Os exames histopatológicos devem incidir, no mínimo, no seguinte:

— todos os tecidos dos animais dos grupos de controlo e dos grupos expostos à dose mais elevada,

— todos os tecidos dos animais que morreram ou foram eutanasiados durante o estudo,

— todos os tecidos com anomalias macroscópicas,

— os tecidos dos órgãos-alvo, e os tecidos que revelaram alterações atribuíveis à exposição ao produto químico em estudo nos animais dos grupos expostos à dose mais elevada, de todos os animais de todos os outros grupos expostos a uma dose do produto químico,

— no caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem examinar-se ambos.

▼M4

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

49. Devem ser apresentados dados por animal relativos a todos os parâmetros avaliados. Esses dados devem ainda ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais no início do ensaio, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados, a hora de cada morte ou eutanásia, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, a descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o momento do seu aparecimento e a sua duração e intensidade, o número de animais que apresentaram lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais que apresentaram cada tipo de lesão. Devem constar dos quadros de resumo dos dados as médias e os desvios-padrão (no caso dos dados contínuos) correspondentes aos animais que apresentaram lesões ou efeitos tóxicos, além do grau das lesões.

50. Os dados históricos de controlo podem ser úteis para a interpretação dos resultados do estudo, por exemplo, quando houver indicações de que os dados provenientes dos grupos de controlo em paralelo divergem significativamente de dados recentes referentes a animais de controlo da mesma colónia e da mesma unidade de ensaio. Caso sejam avaliados dados históricos de controlo, estes devem provir do mesmo laboratório, reportar-se a animais da mesma idade e estirpe e ter sido gerados nos cinco anos anteriores ao estudo em causa.

51. Quando pertinente, devem ser avaliados os resultados numéricos por um método estatístico corrente adequado. Os métodos estatísticos e os dados a analisar devem ser escolhidos no planeamento do estudo (ponto 8). Nessa escolha, devem ser previstos os ajustamentos em função do grau de sobrevivência que se revelem necessários.

Relatório dos ensaios

52. Dados a constar do relatório dos ensaios:

Produto químico em estudo:

— natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas,

— dados de identificação,

— proveniência,

— número de lote,

— boletim de análises químicas.

Veículo (se for o caso):

— justificação da escolha do veículo (se não for água).

Animais estudados:

— espécie e estirpe utilizadas e justificação da opção tomada,

— número, idade e sexo dos animais no início dos ensaios,

▼M4

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.,

— peso de cada animal no início do ensaio.

Condições de realização dos ensaios:

— fundamentação da via de administração e das doses escolhidas,

— métodos estatísticos utilizados na análise dos dados, se for o caso,

— elementos relativos à formulação do produto químico em estudo/à incorporação do mesmo na dieta fornecida aos animais,

— dados analíticos relativos à concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação,

— via de administração e elementos relativos à administração do produto químico em estudo,

— no caso dos estudos por inalação: exposição unicamente nasal ou de corpo inteiro,

— doses reais (mg/kg de peso corporal/dia) e, se for caso disso, fator de conversão entre a concentração do produto químico em estudo na dieta ou na água de beber (mg/kg ou ppm) e a dose real,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água.

Resultados (apresentar quadros de resumo dos dados e os dados por animal):

— dados de sobrevivência,

— pesos corporais e alterações de peso corporal,

— consumo de alimentos, cálculos da eficiência alimentar (se efetuados) e consumo de água (se for caso disso),

— dados das respostas tóxicas em função do sexo e da dose administrada, incluindo os sinais de toxicidade,

— natureza, incidência (e, se quantificada, intensidade) e duração dos sinais clínicos observados (transitórios ou permanentes),

— exame oftalmológico,

— análises hematológicas,

— análises de bioquímica clínica,

— análises de urina,

— resultados dos estudos de neurotoxicidade ou de imunotoxicidade eventualmente efetuados,

— peso corporal terminal,

— peso de cada órgão (e relação com o peso corporal, se for caso disso),

— resultados das autópsias,

— descrição pormenorizada dos resultados histopatológicos resultantes da exposição dos animais ao produto químico em estudo,

— dados de absorção, se disponíveis.

▼M4

Tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.

Discussão dos resultados, nomeadamente:

— relações dose-resposta,

— análise dos dados disponíveis sobre modos de ação,

— discussão dos eventuais modelos,

— determinação das doses de referência, do NOAEL e do LOAEL,

— dados históricos de controlo,

— importância para o ser humano.

Conclusões:

REFERÊNCIAS:

(1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Roma, 1995). Documento de trabalho interno. Environment Directorate, OCDE, Paris.

(2) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. *ATLA* 32:163-208.

(3) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 40:145-191.

(4) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206:437-445.

(5) Capítulo B.27 deste anexo, "Ensaio de toxicidade oral subcrónica — Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias".

(6) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – segunda edição. Series on Testing and Assessment No. 116. Disponível no sítio Web público de *Test Guidelines* da OCDE (www.oecd.org/env/testguidelines).

(7) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(8) Capítulo B.8 deste anexo, "Toxicidade subaguda por inalação: estudo de 28 dias".

(9) Capítulo B.29 deste anexo, "Toxicidade subcrónica por inalação: Estudo de 90 dias".

(10) Capítulo B.9 deste anexo, "Toxicidade (dérmica) da dose repetida (28 dias)".

(11) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36:1-7.

(12) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36:9-35.

(13) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36:37-68.

▼M4

(14) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36:69-98.

(15) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies. Series on Testing and Assessment No. 35; Series on Pesticides No. 14. ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.

(16) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

(17) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection. *Critical Reviews in Toxicology* 37(9):729 - 837.

(18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(19) Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (JO L 276 de 20.10.2010, p. 33).

(20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.

(24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(25) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40:999-1 003.

(26) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9:691-704.

(27) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108:267-283.

(28) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1:233-236.

(29) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13:599-609.

▼**M4**

(30) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29:198-201.

(31) Documento da EMEA (*draft*) "Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity" (Ref.ª EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32:126-131.

▼**M4**

Apêndice 1

DEFINIÇÃO

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼B

B.31. ESTUDO DE TOXICIDADE SOBRE O DESENVOLVIMENTO PRÉ-NATAL

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 414 (2001) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio de toxicidade sobre o desenvolvimento destina-se a fornecer informação geral sobre os efeitos de exposição pré-natal no animal de ensaio prenhe e no organismo em desenvolvimento no útero; pode incluir a avaliação de efeitos maternos e de morte, anomalias estruturais ou alterações no crescimento do feto. Apesar de constituírem uma parte importante do desenvolvimento, as deficiências funcionais não são contempladas neste método de ensaio, poderão ser testadas num estudo independente ou em complementaridade ao presente estudo, usando o método de ensaio de neurotoxicidade sobre o desenvolvimento. Para obter informações relativas aos ensaios sobre deficiências funcionais e outros efeitos pós-natais, deverão consultar-se os métodos de ensaio para o estudo da toxicidade sobre a reprodução em duas gerações e o estudo da neurotoxicidade sobre o desenvolvimento, conforme seja apropriado.

Em situações pontuais, poderá revelar-se oportuno introduzir adaptações específicas no método de ensaio com base em informações relativas, por exemplo, às propriedades físico-químicas ou toxicológicas da substância de ensaio. Contudo, este procedimento só será aceitável quando existirem fortes razões científicas de que as alterações ao método conduzirão a um ensaio mais informativo. Nesse caso, os fundamentos científicos que justificam as adaptações introduzidas deverão ser cuidadosamente documentados no relatório do estudo.

1.2. DEFINIÇÕES

Toxicologia sobre o desenvolvimento: estudo dos efeitos adversos que se manifestam num organismo em desenvolvimento em resultado da exposição a determinada substância antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal ou no período que decorre desde o nascimento até à maturação sexual. As principais manifestações de toxicidade sobre desenvolvimento incluem: 1) morte do organismo, 2) anomalia estrutural, 3) alterações no crescimento e 4) deficiência funcional. Anteriormente, a toxicologia sobre o desenvolvimento era, em muitos casos, designada por teratologia.

Efeito adverso: qualquer alteração à normalidade relacionada com o tratamento que diminua a capacidade de um organismo para sobreviver, reproduzir-se ou adaptar-se ao meio ambiente. No que respeita à toxicologia sobre o desenvolvimento, esta definição abrange, no seu sentido mais lato, todos os efeitos que interfiram no desenvolvimento normal do concepto, antes e após o nascimento.

Alterações no crescimento: alteração de peso ou tamanho do corpo ou de um órgão de um descendente.

Alterações (anomalias): alterações estruturais no desenvolvimento, que incluem as malformações e as variações (28).

Malformação/Anomalia grave: alteração estrutural considerada prejudicial para o animal (pode também ser letal), cuja ocorrência é normalmente rara.

▼B

Variação/Anomalia ligeira: alteração estrutural pouco ou nada prejudicial para o animal; pode ser transiente e ocorrer com relativa frequência na população de controlo.

Concepto: conjunto dos derivados de um óvulo fertilizado em qualquer estádio de desenvolvimento, desde a fertilização até ao nascimento, incluindo as membranas extraembrionárias, bem como o embrião ou o feto.

Implantação (nidação): ligação do blastocisto ao revestimento epitelial do útero, incluindo a sua penetração através do epitélio uterino e a sua implantação no endométrio.

Embrião: estádio inicial ou em desenvolvimento de qualquer organismo; mais especificamente, é o produto da fertilização de um óvulo nas fases de desenvolvimento que decorrem desde o aparecimento da corda dorsal até à formação de todas as estruturas principais.

Embriotoxicidade: conjunto dos efeitos prejudiciais sobre a estrutura, desenvolvimento, crescimento e/ou viabilidade normais de um embrião.

Feto: organismo em gestação no período pós-embrionário.

Toxicidade fetal: conjunto dos efeitos prejudiciais sobre a estrutura, desenvolvimento, crescimento e/ou viabilidade normais de um feto.

Aborto: expulsão prematura do útero dos produtos da concepção: o embrião ou um feto inviável.

Reabsorção: reabsorção (presente ou passada) de um produto de concepção morto depois de implantado no útero.

Reabsorção prematura: sinais de implantação sem existência reconhecível de embrião/feto.

Reabsorção tardia: embrião ou feto morto, que apresentam alterações degenerativas externas.

NSEAO: abreviatura para nível sem efeito adverso observável; corresponde à maior dose ou ao maior nível de exposição para o qual não se observam efeitos adversos relacionados com o tratamento.

1.3. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Normalmente, a substância de ensaio é administrada aos animais prenhes desde o momento da implantação (pelo menos) até ao dia anterior ao previsto para o sacrifício. O dia do sacrifício deverá ser agendado o mais próximo possível da data esperada para o parto, sem que seja descurada a possibilidade de ocorrerem parto prematuro e a consequente perda de dados. O método de ensaio não se destina apenas a examinar o período da organogénese (por exemplo, dias 5--15 em roedores e dias 6-18 no coelho); permite também avaliar efeitos de toxicidade desde a pré-implantação (se apropriado) e ao longo de todo o período de gestação até ao dia anterior à operação cesariana. As fêmeas são sacrificadas pouco antes da operação cesariana, após o que os conteúdos uterinos são examinados e os fetos inspeccionados para detectar a presença de anomalias externas visíveis e alterações dos tecidos moles e do esqueleto.

▼B

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1. **Selecção de espécies animais**

Recomenda-se que o ensaio seja realizado com as espécies mais relevantes e que se utilizem as espécies e estirpes laboratoriais mais vulgarmente usadas em ensaios de toxicidade sobre o desenvolvimento pré-natal. As espécies preferidas para ensaio são o rato, no caso de roedores, e o coelho, no caso de não roedores. O uso de outras espécies deverá ser devidamente justificado.

1.5.2. **Condições de alojamento e alimentação**

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser 22 ºC (+ 3 ºC) para roedores e 18 ºC (± 3 ºC) para coelhos. A humidade relativa deverá ser 50 %-60 %, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30 % e um máximo que, preferivelmente, não deverá exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A alimentação pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber.

O acasalamento deve ocorrer em gaiolas adequadas para o efeito. Embora seja preferível alojar individualmente os animais durante o acasalamento, considera-se aceitável o alojamento conjunto de um pequeno número de animais.

1.5.3. **Preparação dos animais**

Devem usar-se animais saudáveis que tenham permanecido nas condições laboratoriais durante pelo menos cinco dias antes do ensaio para aclimatação e que não tenham sido sujeitos a experiências anteriores. Os animais de ensaio devem ser caracterizados no que respeita à espécie, estirpe, proveniência, sexo, peso e/ou idade. Os animais de todos os grupos de ensaio devem ser, tanto quanto possível, uniformes quanto ao peso e à idade. Devem usar-se fêmeas jovens, adultas e nulíparas em todos os níveis de dose. As fêmeas devem acasalar com machos da mesma espécie e estirpe, devendo evitar-se o acasalamento entre irmãos. Em roedores, considera-se o dia 0 de gestação aquele em que se observa um rolhão vaginal e/ou esperma. Em coelhos, o dia 0 é normalmente o dia do coito ou da inseminação artificial, caso esta técnica seja usada. As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Cada animal deve receber um número de identificação individualizado. As fêmeas acasaladas devem ser distribuídas pelos grupos de controlo e de tratamento de forma aleatória. Caso tenha havido alojamento conjunto de várias fêmeas durante o acasalamento, os animais de cada conjunto devem ser distribuídos uniformemente pelos grupos de ensaio. Do mesmo modo, as fêmeas inseminadas pelo mesmo macho devem ser distribuídas equitativamente pelos vários grupos.

1.6. PROCEDIMENTO

1.6.1. **Número e sexo dos animais**

Cada grupo de ensaio e de controlo deve comportar um número de fêmeas suficiente para que se obtenham cerca de 20 animais com locais de implantação no momento da necropsia. Os grupos com menos de 16 animais com locais de implantação poderão ser considerados como inadequados. A mortalidade materna não invalida necessariamente o estudo, desde que não seja superior a cerca de 10 %.

▼B

1.6.2. **Preparação das doses**

Se for usado um agente de transporte ou outro aditivo para facilitar a administração das doses, deverão ser tomadas em consideração as seguintes características: efeitos na absorção, distribuição, metabolismo e retenção ou excreção da substância de ensaio; efeitos nas propriedades químicas da substância de ensaio susceptíveis de alterar as suas características tóxicas; e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais. O agente de transporte não deverá apresentar toxicidade sobre o desenvolvimento nem exercer efeitos na reprodução.

1.6.3. **Dosagem**

Normalmente, a substância de ensaio deverá ser administrada diariamente, desde a implantação (por exemplo, no dia cinco pós-acasalamento) até ao dia anterior ao previsto para a operação cesariana. Se estudos anteriores eventualmente disponíveis não indicarem um elevado potencial para perdas pré-implantação, o tratamento poderá prolongar-se de forma a abranger todo o período de gestação, desde o acasalamento até ao dia anterior ao previsto para o sacrifício. É sabido que a manipulação imprópria ou a sujeição a tensões durante a gravidez podem resultar em perdas pré-natais, pelo que devem evitar-se manipulações desnecessárias dos animais prenhes e tensões de origem externa, tais como ruído, de forma a minimizar as perdas por factores não relacionados com o tratamento.

Devem utilizar-se pelo menos três níveis de dose e um controlo simultâneo. Os animais saudáveis devem ser distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e de tratamento. Os níveis de dose devem ser espaçados de forma a produzir uma gradação de efeitos tóxicos. A escolha do nível de dose máximo deve ter como objectivo produzir alguma toxicidade sobre o desenvolvimento e/ou sobre a mãe (sinais clínicos ou diminuição do peso corporal), mas não a morte ou sofrimento agudo, salvo se existirem limitações impostas pela natureza fisico-química ou pelas propriedades biológicas da substância de ensaio. Pelo menos um dos níveis de dose intermédios deverá produzir efeitos tóxicos mínimos observáveis. O nível de dose mais baixo não deverá induzir qualquer sinal de toxicidade sobre a mãe ou sobre o desenvolvimento. Deve seleccionar-se uma sequência descendente de níveis de dose que permita detectar qualquer resposta relacionada com a dosagem e determinar o nível sem efeito adverso observável (NSEAO). Frequentemente, a melhor forma de estabelecer estas sequências consiste no espaçamento das doses em série geométrica, usando factores de dois ou de quatro. A adição de um quarto grupo de ensaio é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes entre as dosagens (ou seja, com um factor superior a 10). Embora um dos objectivos do ensaio seja a determinação do NSEAO materno, podem considerar-se aceitáveis estudos que não permitam o cálculo deste valor (1).

A escolha dos níveis de dose deverá tomar em consideração todos os dados de toxicidade existentes, bem como informações adicionais sobre o metabolismo e toxicocinética da substância de ensaio ou de substâncias relacionadas. Estas informações poderão ser também usadas para demonstrar a adequação do regime de dosagem.

Deve usar-se um grupo de controlo simultâneo, que poderá ser um grupo com tratamento simulado ou, se for usado um agente de transporte para administrar a substância de ensaio, um grupo de controlo do agente de transporte. Todos os grupos devem ser tratados com o mesmo volume da substância de ensaio ou do agente de transporte. Os animais do(s) grupo(s) de controlo devem ser manipulados de forma idêntica aos animais dos grupos de ensaio. Os grupos de controlo do agente de transporte deverão receber o volume máximo de agente de transporte utilizado no ensaio (ou seja, um volume idêntico ao do grupo do nível de dose mais baixo).

▼B

1.6.4. **Ensaio-limite**

Se um ensaio com um nível de dose oral de pelo menos 1 000 mg/kg de peso corporal/dia, realizado de acordo com os procedimentos descritos neste estudo, não provocar toxicidade observável nos animais prenhes nem na sua descendência e se, para além disso, os dados existentes sobre compostos estrutural e/ou metabolicamente relacionados com a substância de ensaio não sugerirem a possível ocorrência de efeitos, poderá considerar-se desnecessário realizar um ensaio completo com três níveis de dose. Nos casos em que se preveja exposição humana, poderá ser necessário aumentar o nível de dose oral no ensaio-limite. Quando se usam outras formas de administração, como inalação ou aplicação cutânea, as propriedades físico-químicas da substância de ensaio são muitas vezes indicativas e limitantes do nível máximo de exposição praticável (por exemplo, a aplicação cutânea não deverá causar toxicidade local grave).

1.6.5. **Administração das doses**

Na maior parte dos casos, a substância de ensaio ou o agente de transporte são administrados oralmente por intubação. Se for usada outra via de administração, o experimentador deverá indicar e justificar as razões que presidiram à sua escolha; nesse caso, poderá ser necessário introduzir modificações apropriadas no método de ensaio (2)(3)(4). A substância de ensaio deve ser administrada todos os dias aproximadamente à mesma hora.

Normalmente, a dose a administrar a cada animal é calculada com base na determinação mais recente do seu peso corporal. No entanto, o ajuste das doses durante o último terço da gravidez deve ser feito com precaução. A escolha da dose deve tomar em consideração dados de estudos anteriores para evitar um excesso de toxicidade materna; contudo, se tal suceder, as mães com indícios de toxicidade excessiva devem ser sacrificadas. Se vários animais prenhes apresentarem sinais de excesso de toxicidade, deverá considerar-se a possibilidade de pôr termo ao grupo de dose a que pertencem. A administração por gavagem deve ser feita, de preferência, numa toma única, usando uma sonda gástrica ou uma cânula de intubação apropriada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado numa toma depende do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 1 ml/100 g de peso corporal; exceptuam-se as soluções aquosas, que podem ser administradas na proporção de 2 ml/100 g de peso corporal. Quando se usa óleo de milho como agente de transporte, o volume máximo aceitável é de 0,4 ml/100 g de peso corporal. Deve minimizar-se a variabilidade do volume de ensaio efectuando ajustes nas concentrações, de forma a assegurar a constância do volume em todos os níveis de dose.

1.6.6. **Observação das mães**

Devem efectuar-se observações clínicas pelo menos uma vez por dia, de preferência sempre à(s) mesma(s) hora(s). A escolha do momento da observação deve tomar em consideração o período de efeitos máximos previsto que se verifica após a administração da dose. Estas observações devem ser descritas num registo, que deverá conter indicações sobre a condição dos animais, incluindo mortalidade, estado moribundo, alterações pertinentes do comportamento e todos os sinais de manifesta toxicidade.

1.6.7. **Peso corporal e consumo de alimento**

Os animais devem ser pesados no dia 0 de gestação (se os animais acasalados forem fornecidos por um criador externo, a pesagem poderá ser feita até ao dia três de gestação, o mais tardar), no primeiro dia de dosagem, de três em três dias (pelo menos) durante o período de dosagem e no dia do sacrifício.

▼B

Devem efectuar-se registos do consumo de alimento de três em três dias, coincidindo com dias da determinação do peso corporal.

1.6.8. **Inspecção pós-morte**

As fêmeas devem ser sacrificadas no dia anterior ao previsto para o parto. As fêmeas que apresentem sinais de aborto ou parto prematuro antes da data marcada para o sacrifício deverão ser mortas antecipadamente e submetidas a um exame macroscópico completo.

No momento do sacrifício ou da morte durante o estudo, as mães serão objecto de um exame macroscópico, a fim de se detectarem quaisquer anomalias estruturais ou modificações patológicas. A observação das mães durante a operação de cesariana e a subsequente análise fetal deverão ser feitas de preferência sem que os restantes animais do grupo se apercebam para evitar perturbações.

1.6.9. **Exame dos conteúdos uterinos**

Imediatamente após o sacrifício ou o mais cedo possível depois da morte espontânea, os úteros serão retirados para se averiguar o estado de gravidez dos animais. Os úteros que não se apresentem grávidos devem ser submetidos a exames adicionais (por exemplo, coloração com sulfureto de amónio em roedores e coloração de Salewsky ou um método alternativo apropriado em coelhos) para confirmar o estado de não gravidez (5).

Devem pesar-se os úteros grávidos, incluindo o colo. Não serão considerados para pesagem os úteros grávidos provenientes de animais encontrados mortos durante o estudo.

Deve determinar-se o número de corpos amarelos nos animais prenhes.

Devem examinar-se os conteúdos uterinos para determinar os números de embriões ou de fetos mortos, bem como o número de fetos viáveis. Deve avaliar-se o grau de reabsorção, a fim de determinar o tempo relativo da morte do concepto (ver secção 1.2).

1.6.10. **Exame dos fetos**

Devem determinar-se o sexo e o peso corporal de cada feto.

Cada feto será objecto de um exame para detectar alterações externas (6).

Os fetos devem ser examinados para detectar alterações do esqueleto e dos tecidos moles (por exemplo, variações e malformações ou anomalias) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). É aconselhável (mas não obrigatório) proceder à categorização das alterações fetais, explicitando claramente os critérios usados para definir cada categoria. O aparelho reprodutor deve ser objecto de especial atenção, devendo ser inspeccionado quanto a sinais de alterações no desenvolvimento.

No caso de roedores, devem preparar-se e examinar-se cerca de metade dos animais de cada ninhada para detecção de alterações do esqueleto; os restantes animais serão preparados e examinados para determinar alterações dos tecidos moles, usando métodos aprovados de seccionamento em série ou técnicas adequadas de dissecação macroscópica cuidadosa.

▼B

No caso de não roedores (por exemplo, o coelho), todos os fetos serão examinados para detectar alterações dos tecidos moles e do esqueleto. Os corpos serão preparados por dissecação cuidadosa e examinados quanto à existência de alterações dos tecidos moles; o exame pode incluir procedimentos adicionais para avaliação da estrutura cardíaca interna (25). Metade dos fetos será decapitada e as cabeças removidas serão processadas para avaliação de alterações de tecidos moles (incluindo olhos, cérebro, meatos nasais e língua), usando métodos correntes de seccionamento em série (26) ou outros métodos de sensibilidade idêntica. Os corpos dos fetos decapitados e os restantes fetos intactos serão processados e examinados para se detectarem alterações do esqueleto, recorrendo a métodos idênticos aos descritos para roedores.

2. DADOS

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os dados relativos às mães e aos seus descendentes devem ser registados individualmente e resumidos em forma tabular, indicando, para cada grupo de ensaio, o número de animais no início do ensaio, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou sacrificados por razões humanitárias, o momento de todas as mortes (espontâneas ou provocadas), o número de fêmeas grávidas, o número de animais com sinais de toxicidade, uma descrição dos sinais de toxicidade observados (incluindo o momento do aparecimento, a duração e a intensidade), os tipos de observações embrionárias/fetais e todos os dados relevantes sobre as ninhadas.

Os resultados numéricos devem ser avaliados por um método estatístico apropriado, usando a ninhada como unidade para a análise de dados. Deve usar-se um método estatístico geralmente aceite; a sua escolha deve fazer parte do planeamento do estudo e ser devidamente justificada. Devem também registar-se os dados relativos a animais que não sobreviveram até à data prevista para o sacrifício. Quando apropriado, estes dados poderão ser incluídos nas médias de grupos; contudo, a sua importância e, consequentemente, a sua inclusão ou exclusão em qualquer média de grupo devem ser avaliadas e justificadas caso a caso.

2.2. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados recolhidos no Estudo de Toxicidade sobre o Desenvolvimento Pré-Natal deverão ser analisados em termos dos efeitos observados. Esta análise deverá considerar a seguinte informação:

— resultados do ensaio relativos à mãe e ao embrião/feto, incluindo uma avaliação da relação (ou da ausência de relação) entre a exposição dos animais à substância de ensaio e a incidência e a gravidade de todos os efeitos observados;

— critérios usados para a categorização das alterações externas, dos tecidos moles e do esqueleto dos fetos, caso tenha sido feita;

▼B

— dados de controlo de estudos anteriores, quando apropriado, a fim de consolidar a interpretação dos resultados do presente estudo;

— números usados no cálculo de todas as percentagens ou índices;

— análise estatística adequada dos resultados do estudo, quando apropriado; deverá incluir informação suficiente sobre o método de análise para que um examinador/estatístico independente possa reavaliar e reconstituir a análise.

No caso de o estudo demonstrar a inexistência de qualquer efeito tóxico, deverá considerar-se a possibilidade de realizar investigações adicionais no sentido de definir a absorção e a biodisponibilidade da substância de ensaio.

2.3. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A finalidade do estudo de toxicidade sobre o desenvolvimento pré-natal reside na obtenção de informações relativas aos efeitos de exposição repetida a uma substância durante a gravidez tanto nas mães como no desenvolvimento intra-uterino dos seus descendentes. A interpretação dos resultados deve tomar em consideração dados de estudos subcrónicos, de reprodução e toxicocinéticos, entre outros eventualmente disponíveis. O estudo enfatiza de igual modo a toxicidade geral, que pode ser avaliada pela toxicidade sobre a mãe, e a toxicidade sobre o desenvolvimento. Assim, os resultados obtidos vão permitir estabelecer, até certo ponto, a distinção entre i) os efeitos sobre o desenvolvimento não associados a toxicidade geral e ii) os efeitos sobre o desenvolvimento que apenas são induzidos em níveis que também são tóxicos para a mãe (27).

3. **RELATÓRIO**

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações específicas:

Substância de ensaio:

— natureza física e, quando relevante, propriedades físico-químicas;

— identificação, incluindo o número CAS, caso este seja conhecido ou esteja definido;

— pureza.

Agente de transporte (se apropriado):

— caso o agente de transporte não seja água, uma justificação para a sua escolha.

Animais de ensaio:

— espécie e estirpe usadas;

— número e idade dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.;

— pesos individuais dos animais no início do ensaio.

Condições de ensaio:

— razões que presidiram à escolha dos diferentes níveis de dose;

— informação pormenorizada sobre a formulação da substância de ensaio/preparação da dieta, concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação;

▼B

— informação pormenorizada sobre a administração da substância de ensaio;

— conversão da concentração da substância de ensaio na dieta/água de beber (ppm) para a dose real (mg/kg de peso corporal/dia), se aplicável;

— condições ambientais;

— informação pormenorizada sobre a qualidade dos alimentos e da água.

Resultados:

Dados de resposta tóxica materna por dose, incluindo, entre outras informações:

— número de animais no início do ensaio, número de animais sobreviventes, número de animais prenhes, número de animais que abortaram, número de animais com parto prematuro;

— dia da morte no decurso do estudo ou indicação dos animais sobreviventes no termo da experiência;

— os dados relativos a animais que não sobreviveram até à data prevista para o sacrifício devem ser incluídos no relatório, mas não devem ser usados em comparações estatísticas entre grupos;

— dia da observação de cada sinal de anomalia clínica e subsequente evolução dessa anomalia;

— peso corporal, alteração do peso corporal e peso do útero grávido; opcionalmente, alteração do peso corporal corrigida em relação ao peso do útero grávido;

— consumo de alimento e consumo de água (caso este tenha sido medido);

— resultados da necropsia, incluindo o peso uterino;

— deverão indicar-se os valores dos NSEAO para os efeitos maternos e para os efeitos sobre o desenvolvimento.

Desenvolvimento atingido nas ninhadas com implantes em cada nível de dose, incluindo:

— número de corpos amarelos;

— número de implantações, número e percentagem de fetos vivos e mortos e de reabsorções;

— número e percentagem de perdas pré e pós-implantação.

Desenvolvimento atingido nas ninhadas com fetos vivos em cada nível de dose, incluindo:

— número e percentagem de descendentes vivos;

— proporção entre os sexos;

— peso corporal fetal, de preferência por sexo e nos dois sexos em conjunto;

— malformações externas, dos tecidos moles e do esqueleto, bem como outras alterações relevantes;

— critérios usados na categorização, se apropriado;

▼B

— número total e percentagem de fetos e ninhadas que apresentem qualquer alteração externa, dos tecidos moles ou do esqueleto, bem como os tipos e incidências de anomalias individuais e outras alterações relevantes.

Análise dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Kavlock R.J. et al., (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16, p. 399-410.

(2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z., (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology*, 14, p. 386-398.

(3) Wong, B.A., et al., (1997) Developing Specialised Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities*, 17, p. 1-8.

(4) US Environmental Protection Agency, (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E., (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie*, 247, 367.

(6) Edwards, J.A., (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16, p. 171-173.

(8) Igarashi, E. et al., (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32, p. 381-391.

(9) Kimmel, C.A. et al., (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47, p. 229-242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology*, 37, p. 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127, 291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11, p. 313-320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 9, p. 398-408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology*, 8, p. 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology*, 46, p. 169-181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, p. 163-173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy*, 41, p. 411-445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology*, 39, p. 61-63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy*, 36, 313-355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 4, p. 181-188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, p. 251-277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 28, p. 233-239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology*, 9, p. 37-38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, p. 126-144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register*, 56, p. 63798-63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology, 55, p. 249-292.

▼M4

B.32 ESTUDOS DE CARCINOGENICIDADE

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 451 (2009) da OCDE. O *Test Guideline* 451 (TG 451) inicial relativo aos estudos de carcinogenicidade foi adotado em 1981. Entendeu-se necessário rever o método B.32 para dar conta da evolução recente no domínio do bem-estar animal e da regulamentação (2)(3)(4)(5)(6). A atualização do método B.32 decorreu paralelamente à revisão dos capítulos B.30 ("Estudos de toxicidade crónica") e B.33 ("Estudos combinados de toxicidade crónica e carcinogenicidade") deste anexo. Visa-se obter mais dados a partir dos animais utilizados nos estudos e dispor de mais elementos para a escolha das doses. O método B.32 foi concebido para o ensaio de uma vasta gama de produtos químicos, nomeadamente pesticidas e produtos químicos industriais. Alguns aspetos e requisitos podem, porém, ser diferentes no caso dos produtos farmacêuticos (ver o documento de orientações "*Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals*", publicado pela Conferência Internacional de Harmonização).

2. Na sua maioria, os estudos de carcinogenicidade são efetuados em roedores. Este método destina-se, portanto, a ser aplicado, preferencialmente, a estudos em espécies de roedores. Caso seja necessário efetuar estudos noutras espécies, devem aplicar-se os princípios e procedimentos descritos neste método e no capítulo B.27 deste anexo — "Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias" (6) —, com as adaptações necessárias. Para mais orientações, consultar o documento de orientações n.º 116 da OCDE, relativo à conceção e realização de estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (7).

3. As três vias principais de administração nos estudos de carcinogenicidade são a via oral, a via dérmica e a via inalatória. A via de administração escolhida depende das características físico-químicas do produto químico em estudo e da via predominante de exposição humana. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a escolha da via de exposição.

4. Este método centra-se na exposição por via oral, que é a via habitualmente mais utilizada nos estudos de carcinogenicidade. Embora possa também ser necessário efetuar estudos de carcinogenicidade por via dérmica ou por inalação para avaliar o risco para a saúde humana e/ou isso possa mesmo ser exigido pela regulamentação aplicável, estas duas vias de exposição são bastante complexas do ponto de vista técnico e esses estudos têm de ser concebidos para cada caso concreto. Porém, no que diz respeito às recomendações relativas aos períodos de exposição, aos parâmetros clínicos e patológicos e a outros aspetos, o método aqui descrito para caracterização e avaliação da carcinogenicidade por administração oral pode constituir a base de um protocolo para estudos por inalação e/ou por via dérmica. A OCDE publicou orientações relativas ao estudo da administração de produtos químicos por via dérmica (7) e por inalação (7)(8). Para a conceção de estudos a longo prazo com exposição por via inalatória, recomenda-se especificamente a consulta dos capítulos B.8 (9) e B.29 (10) deste anexo e do documento de orientações da OCDE relativo a ensaios de toxicidade aguda por inalação (8). No caso dos ensaios por via dérmica, deve consultar-se o capítulo B.9 (11) deste anexo.

▼M4

5. Os estudos de carcinogenicidade fornecem informações sobre os perigos para a saúde que podem potencialmente advir da exposição repetida durante um período que pode abranger todo o tempo de vida da espécie utilizada. Estes estudos fornecem informações sobre os efeitos tóxicos do produto químico em causa, incluindo o potencial de carcinogénese, podendo indicar os órgãos afetados e a possibilidade de acumulação. Podem igualmente servir para obter estimativas do nível sem observação de efeitos adversos ("*no observed adverse effect level*", NOAEL) para efeitos tóxicos e, no caso dos produtos cancerígenos não genotóxicos, para respostas tumorais, com base nas quais se podem estabelecer critérios de segurança para a exposição humana. Salienta-se a necessidade de um exame clínico cuidadoso dos animais, de modo a obter-se o máximo de informação possível.

6. Entre os objetivos dos estudos de carcinogenicidade efetuados por este método contam-se os seguintes:

— identificação das propriedades cancerígenas do produto químico em estudo suscetíveis de aumentar a incidência de neoplasias ou a proporção de neoplasias malignas, ou de reduzir o tempo que as neoplasias demoram a surgir, comparativamente aos grupos de controlo em paralelo,

— identificação do órgão ou órgãos afetados pela carcinogénese,

— identificação do tempo que as neoplasias demoram a surgir,

— caracterização de relações entre a dose administrada e a resposta tumoral,

— determinação de níveis sem observação de efeitos adversos (NOAEL) ou ponto de partida para o estabelecimento de doses de referência,

— extrapolação de efeitos cancerígenos para doses baixas de exposição humana,

— obtenção de dados para verificação de hipóteses relativas a modos de ação (2)(7)(12)(13)(14)(15).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. Antes de efetuar um estudo com vista à caracterização e avaliação da carcinogenicidade potencial de um produto químico, o laboratório que efetuará os ensaios deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa, a fim de adaptar o estudo de modo a melhorar a eficiência da determinação do potencial cancerígeno e para minimizar o recurso a animais. É especialmente importante conhecer e ter em conta o modo de ação do agente cancerígeno suspeito (2)(7)(12)(13)(14)(15), dado que a conceção ótima do estudo pode ser diferente consoante o produto químico em causa seja ou não um agente cancerígeno/genotóxico reconhecido ou se suspeite ou não de que o possa ser. Para mais orientações sobre o modo de ação, consultar o documento de orientações n.º 116 (9).

8. Entre os elementos que podem ser úteis na conceção do estudo contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em causa, resultados de ensaios de toxicidade (incluindo de genotoxicidade) *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana, dados (Q)SAR — "*(quantitative) structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e dados de mutagenicidade/genotoxicidade, carcinogenicidade e outros dados toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins, dados toxicocinéticos disponíveis (dados cinéticos associados a uma dose única ou a doses

▼M4

múltiplas) e dados provenientes de outros estudos com exposição repetida. Só deve proceder-se à determinação da carcinogenicidade depois de obtidos dados de toxicidade preliminares provenientes de estudos de toxicidade com repetição da dose administrada durante 28 e/ou 90 dias. Os ensaios a curto prazo da promoção do desencadeamento de cancros também podem fornecer informações úteis. Deve ponderar-se uma abordagem faseada dos ensaios de carcinogenicidade no âmbito da avaliação global dos potenciais efeitos adversos na saúde do produto químico em estudo (16)(17)(18)(19).

9. Antes de iniciar o estudo, devem ser escolhidos, com base no plano experimental e nos objetivos estabelecidos, os métodos estatísticos mais adequados para a análise dos resultados. Entre outros aspetos a considerar, é necessário determinar se o tratamento estatístico deverá contemplar ajustamentos em função do grau de sobrevivência, a análise do risco tumoral acumulado em função do tempo de sobrevivência e a análise do tempo que os tumores demorar a surgir, bem como que tipo de análise deve efetuar-se no caso da morte prematura de todos os animais de um ou mais grupos. Para orientações sobre as análises estatísticas mais adequadas e informação sobre as referências bibliográficas fundamentais dos métodos estatísticos internacionalmente reconhecidos, deve consultar-se o documento de orientações n.º 116 (7), assim como o documento de orientações n.º 35, relativo à análise e avaliação de estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (20).

10. Ao realizar um estudo de carcinogenicidade, recomenda-se que sejam sempre seguidos os princípios e considerações orientadores enunciados no *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (n.º 19) da OCDE (21), nomeadamente os expressos no ponto 62 do mesmo, cuja tradução é a seguinte: *"Nos estudos com repetição da dose administrada, se um animal evidenciar sinais clínicos progressivos da deterioração do seu estado, deve tomar-se uma decisão com conhecimento de causa sobre se deve ou não ser eutanasiado. Para isso, deve ponderar-se, nomeadamente, o valor das informações que seriam obtidas no caso de o animal continuar integrado no estudo, relativamente ao estado geral do mesmo. Caso se decida manter o animal no estudo, deve aumentar-se, tanto quanto necessário, a frequência dos exames que lhe são efetuados. Também é possível, sem prejudicar a finalidade do ensaio, suspender temporariamente a administração do produto químico em estudo – se isso reduzir a dor ou sofrimento do animal – ou reduzir a dose administrada".*

11. Para orientações pormenorizadas sobre os princípios aplicáveis à escolha das doses para estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade e uma discussão dos mesmos, recomenda-se a consulta do documento de orientações n.º 116 (7) e das publicações com as referências 22 e 23 do *International Life Sciences Institute.* A estratégia de base para escolha das doses depende do objetivo ou objetivos principais do estudo (ver o ponto 6). Para escolher doses adequadas, importa estabelecer um equilíbrio entre, por um lado, a identificação dos perigos em jogo e, por outro, a caracterização e importância das respostas às doses reduzidas. Este equilíbrio é especialmente necessário quando se realizam estudos combinados de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo) — ver o ponto 12.

12. Deve ponderar-se a oportunidade de efetuar um estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo), em vez de efetuar separadamente um estudo de toxicidade crónica (capítulo B.30 deste anexo) e um estudo de carcinogenicidade (o presente método B.32). O estudo combinado é mais favorável, em termos de tempo e de custos, do que dois estudos distintos e não prejudica a qualidade dos dados obtidos na etapa de toxicidade crónica nem na etapa de carcinogenicidade. Ao efetuar um estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo), é, porém, necessário prestar especial atenção aos princípios relativos à escolha das doses (pontos 11 e 22 a 25). Reconhece-se, porém, que determinadas regulamentações podem exigir a realização de estudos separados.

▼M4

13. No final do capítulo e no documento de orientações n.º 116 (7) definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

14. Administra-se diariamente, normalmente por via oral, o produto químico em estudo a vários grupos de animais, em doses crescentes de grupo para grupo, durante grande parte do tempo de vida dos animais. A via inalatória ou a via dérmica também podem ser adequadas. Verifica-se atentamente se os animais evidenciam sinais de toxicidade ou se neles estão a desenvolver-se lesões neoplásicas. Autopsia-se os animais que morrem ou são eutanasiados durante os ensaios. No final dos ensaios, eutanasia-se e autopsia-se os animais sobreviventes.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

15. Este método trata, em especial, da caracterização e avaliação da carcinogenicidade em roedores (ver o ponto 2). Pode ponderar-se o recurso a outras espécies se os dados disponíveis indicarem que as espécies em causa permitem prever melhor os efeitos na saúde humana. É necessário justificar a escolha da espécie. Embora possa recorrer-se a outras espécies de roedores, como o ratinho, a espécie preferida é o rato. Se bem que os estudos de carcinogenicidade no ratinho possam ser de pouca utilidade (24)(25)(26), alguns programas obrigatórios continuam a exigir ensaios de carcinogenicidade nessa espécie, a menos que se demonstre que, do ponto de vista científico, este estudo não é necessário. O rato e o ratinho constituem os modelos experimentais preferidos devido à sua longevidade relativamente reduzida, à sua utilização generalizada em estudos farmacológicos e toxicológicos, à sua sensibilidade à indução de tumores e à disponibilidade de estirpes suficientemente caracterizadas destas espécies. Em consequência disto, dispõe-se de numerosos dados sobre a fisiologia e patologia destes animais. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a escolha da espécie e da estirpe.

16. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. De preferência, o estudo de carcinogenicidade deve ser realizado com animais da mesma estirpe e proveniência que os utilizados no estudo ou estudos preliminares mais curtos. Todavia, se os animais da estirpe e proveniência em questão não corresponderem reconhecidamente aos critérios normalmente aceites de sobrevivência em estudos de longo prazo — ver o documento de orientações n.º 116 (7) —, deve ponderar-se a utilização de uma estirpe animal cuja taxa de sobrevivência no estudo a longo prazo seja aceitável. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas.

Condições de alojamento e de alimentação

17. Os animais podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo. É necessário justificar cientificamente a opção pelo alojamento individual (27)(28)(29). As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 30 %, no mínimo, e um valor máximo que, preferencialmente, não deve exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições. A dieta deve satisfazer as necessidades nutricionais da espécie estudada. Os teores de contaminantes da dieta — resíduos de pesticidas, poluentes orgânicos persistentes, fitoestrogénios, metais pesados, micotoxinas e outros – podem influenciar os resultados dos ensaios e devem ser os

▼M4

mais baixos possíveis. É necessário obter periodicamente dados analíticos relativos aos teores de nutrientes e de contaminantes da dieta, pelo menos no início do estudo e quando se muda de lote. Estes dados devem constar do relatório final. É igualmente necessário dispor de dados analíticos da água de beber utilizada no estudo. Quando o produto químico em estudo é administrado por via alimentar, a escolha da dieta pode ser influenciada pela necessidade de nela misturar convenientemente esse produto químico e de satisfazer simultaneamente as exigências nutricionais dos animais.

Preparação dos animais

18. Os animais utilizados devem ser saudáveis e ter sido aclimatados às condições laboratoriais durante, pelo menos, sete dias e não devem ter participado em experiências anteriores. No caso dos roedores, a administração do produto químico em estudo deve iniciar-se logo que possível após o desmame e a aclimatação, de preferência antes de os animais completarem oito semanas. É necessário caracterizar a espécie, a estirpe, a proveniência, o sexo, o peso e a idade dos animais utilizados no estudo. No início do estudo, as diferenças de peso entre os animais de cada sexo devem ser mínimas, não se desviando mais de 20 % do peso médio de todos os animais de cada sexo nele utilizados. Distribuem-se aleatoriamente os animais pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. Depois da distribuição aleatória dos animais, a média de peso corporal não deve diferir significativamente de grupo para grupo de animais do mesmo sexo. Se houver diferenças com significado estatístico, os animais devem, se possível, ser redistribuídos aleatoriamente. Deve atribuir-se a cada animal um número de identificação único, com o qual o animal seja identificado por tatuagem, implantação de *microchip* ou outro método adequado.

PROCEDIMENTO

Número e sexo dos animais

19. Devem ser utilizados animais de ambos os sexos. O número de animais utilizados deve ser suficiente para uma avaliação biológica e estatística aprofundada. Cada grupo de dose e cada grupo de controlo em paralelo não deve, portanto, ter menos de 50 animais de cada sexo. Consoante a finalidade do estudo, poderá aumentar-se a representatividade estatística das principais estimativas distribuindo desigualmente os animais pelos vários grupos de dosagem, constituindo grupos com mais de 50 animais para as doses mais baixas, por exemplo, para estimar o potencial cancerígeno a doses baixas. Todavia, importa ter presente que um aumento ligeiro do tamanho dos grupos aumenta relativamente pouco a representatividade estatística do estudo. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a conceção estatística do estudo e a escolha das doses para maximizar a representatividade estatística.

Eutanásias intercalares e grupos satélites (sentinelas)

20. Caso se justifique do ponto de vista científico, pode prever-se a realização de eutanásias intercalares, por exemplo, ao fim de doze meses, para obter informações sobre a evolução das alterações neoplásicas, bem como dados mecanísticos. Caso já se disponha desses dados, obtidos em estudos de toxicidade por dose repetida realizados com o produto químico em causa, as eutanásias em questão podem não se justificar cientificamente. Caso esteja prevista no estudo a realização de eutanásias intercalares, o número de animais a utilizar com essa finalidade em cada grupo de dose é normalmente de dez de cada sexo. Nesse caso, o número total de animais utilizado no estudo deve ser aumentado no número de animais a eutanasiar antes da conclusão do mesmo. Pode prever-se um grupo de animais sentinelas (habitualmente cinco animais de cada sexo) para verificar, se necessário, o aparecimento de doenças durante o estudo (30). Para mais informações, consultar o documento de orientações n.º 116 (7).

▼M4

Grupos de dose e dosagens

21. O documento de orientações n.º 116 (7) contém orientações relativas a todos os aspetos relacionados com a escolha das doses e os intervalos entre estas. Devem ser utilizados pelo menos três doses e um controlo em paralelo. As doses baseiam-se, normalmente, nos resultados de estudos exploratórios das doses ou de estudos de dose repetida por períodos mais curtos e devem atender aos dados toxicológicos e toxicocinéticos disponíveis sobre o produto químico em estudo ou produtos químicos afins.

22. A menos que tal dose esteja limitada pelas características físico-químicas ou pelos efeitos biológicos do produto químico em estudo, deve escolher-se para dose mais elevada o nível que permita identificar os principais órgãos afetados e os efeitos tóxicos principais sem causar sofrimento, efeitos tóxicos intensos, morbidez nem mortalidade. Tendo presente o referido no ponto 23, normalmente escolhe-se para dose mais elevada uma dose que induza efeitos tóxicos, evidenciados, por exemplo, por uma redução (aproximadamente de 10 %) do ganho de peso corporal. Todavia, consoante os objetivos do estudo (ver o ponto 6), pode escolher-se uma dose máxima inferior à que evidencia efeitos tóxicos, por exemplo, se essa dose induzir um efeito adverso preocupante, mas com pouca influência na longevidade ou no peso corporal dos animais.

23. Podem ser escolhidos doses e intervalos entre doses que permitam estabelecer uma relação dose-resposta e, consoante o modo de ação do produto químico em estudo, determinar um NOAEL ou outro resultado pretendido do estudo, por exemplo, uma dose de referência (ver o ponto 25) ao nível de dose mais baixo. Entre os fatores a ter em conta na escolha das doses mais baixas, contam-se o declive esperado da curva dose-resposta, as doses às quais podem ocorrer alterações importantes ao nível metabólico ou do modo da ação tóxica, o nível ao qual se prevê a ocorrência de um limiar e o nível ao qual se prevê fixar o ponto de partida de extrapolações para doses mais baixas.

24. O intervalo entre as doses depende das características do produto químico em estudo e não pode ser prescrito neste método. Contudo, a utilização de intervalos definidos por um fator de 2 a 4 entre doses consecutivas dá frequentemente bons resultados nestes ensaios, sendo muitas vezes melhor ensaiar um quarto grupo do que recorrer a intervalos muito grandes (por exemplo, mais do que um fator de 6 a 10) entre as dosagens. Em geral, são de evitar fatores superiores a 10. Caso contrário, é necessário justificá-los.

25. Conforme se explica mais em pormenor no documento de orientações n.º 116 (7), entre os aspetos a ter em conta na escolha das doses contam-se os seguintes:

— relações não lineares ou pontos de inflexão conhecidos ou de que se suspeite na curva dose-resposta,

— aspetos toxicocinéticos e doses às quais ocorra, ou não ocorra, indução metabólica, saturação ou não linearidade entre as doses externas e as doses internas,

— lesões precursoras, marcadores de efeitos ou indicadores de processos biológicos fundamentais subjacentes em curso,

— aspetos fundamentais (ou de que se suspeite) do modo de ação, tais como as doses às quais começam a manifestar-se efeitos citotóxicos, os níveis hormonais são perturbados, os mecanismos homeostáticos colapsam, etc.,

▼M4

— regiões da curva dose-resposta que necessitam de estimativas especialmente rigorosas, por exemplo, perto da dose de referência prevista ou da dose à qual se suspeite corresponder um limiar,

— níveis previstos de exposição humana.

26. O grupo de controlo deve ser um grupo não exposto ao produto químico em estudo ou, se for usado um veículo para administrar o produto químico, um grupo de controlo do veículo. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos ensaiados. Caso se utilize um veículo, o grupo de controlo deve receber o volume máximo de veículo utilizado nos grupos expostos ao produto químico em estudo. Se o produto químico for administrado por via da dieta e reduzir significativamente a quantidade desta ingerida por lhe conferir menor palatabilidade, um grupo de controlo adicional alimentado do mesmo modo, em paralelo, pode constituir um grupo de controlo mais adaptado.

Preparação das doses e administração do produto químico em estudo

27. O produto químico em estudo é normalmente administrado por via oral, através da dieta ou da água de beber ou por intermédio de uma sonda esofágica. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre vias e métodos de administração. A via e o método de administração dependem do objetivo do estudo, bem como das propriedades físico-químicas e biodisponibilidade do produto químico em causa e da via e do método de exposição humana predominantes. É necessário fundamentar a via e o método de administração escolhidos. Por razões de bem-estar animal, normalmente só deve optar-se pela utilização de uma sonda esofágica no caso dos agentes relativamente aos quais a via oral e este método de administração representem razoavelmente a exposição humana potencial (por exemplo, através da ingestão de produtos farmacêuticos). No caso dos produtos químicos ingeridos com os alimentos ou disseminados no ambiente, nomeadamente pesticidas, a administração habitual é por incorporação na dieta ou na água de beber. Todavia, para outros cenários — caso da exposição profissional —, pode justificar-se a administração por outras vias.

28. Se necessário, pode suspender-se ou dissolver-se o produto químico em estudo num veículo apropriado. Devem ser tidos em conta as seguintes características que se justifiquem do veículo e de outros aditivos: efeitos na absorção, na distribuição, no metabolismo ou na retenção do produto químico em causa, efeitos nas propriedades químicas do produto químico em estudo suscetíveis de alterarem as características tóxicas do mesmo e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais. Recomenda-se que, sempre que possível, a primeira opção seja uma solução ou suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode optar-se por uma solução ou emulsão num óleo (por exemplo, em óleo de milho); em último caso, poderá recorrer-se a uma solução noutro veículo. Se o veículo utilizado não for água, é necessário conhecer as suas características de toxicidade. Deve dispor-se de informações sobre a estabilidade do produto químico em estudo e a homogeneidade das soluções ou rações de dosagem (consoante o caso) nas condições de administração (por exemplo, por via da dieta).

29. É importante assegurar que a quantidade de um produto químico em estudo administrada através da dieta ou da água de beber não interfere nas exigências normais de nutrição nem no equilíbrio hídrico. No caso dos estudos de toxicidade a longo prazo nos quais o produto químico seja administrado pela via alimentar, a concentração deste nos alimentos não deve, normalmente, exceder 5 % da ração total, a fim de evitar desequilíbrios nutricionais. Se o produto químico em estudo for administrado por via da dieta, pode optar-se por concentrações constantes nesta (mg/kg de alimentos ou ppm) ou por doses constantes em relação ao peso corporal do animal (mg/kg de peso corporal), calculadas semanalmente. Deve indicar-se a opção tomada.

▼M4

30. Em caso de administração por via oral, os animais recebem uma dose quotidiana (sete dias por semana) do produto químico em estudo, no caso dos roedores normalmente durante 24 meses (ver também o ponto 32), É necessário justificar qualquer outro regime de dosagem (por exemplo, cinco dias por semana). Em caso de administração por via dérmica, os animais são normalmente expostos ao produto químico em estudo durante, pelo menos, seis horas por dia, sete dias por semana, conforme se descreve no capítulo B.9 (11) deste anexo, ao longo de 24 meses. A exposição por via inalatória é efetuada durante seis horas por dia, sete dias por semana. Todavia, caso se justifique, também podem expor-se os animais durante cinco dias por semana. O período de exposição neste caso é normalmente de 24 meses. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Se a duração da exposição for inferior a seis horas por dia, é necessário fundamentá-lo. Ver também o capítulo B.8 (9) deste anexo.

31. A administração do produto químico aos animais por meio de uma sonda esofágica deve efetuar-se à mesma hora do dia por meio de um tubo estomacal ou de uma cânula de intubação adequada. Normalmente, administra-se a dose diária de uma só vez. Porém, se o produto químico for, por exemplo, um irritante local, pode repartir-se a mesma dose diária por dois momentos. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal e deve ser o mínimo possível. No caso dos roedores, normalmente não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal (31). Para minimizar diferenças entre volumes administrados, Devem ser efetuados ajustes nas concentrações, de forma que o volume seja o mesmo para todas as doses. Excetuam-se os produtos químicos potencialmente corrosivos ou irritantes, que têm de ser diluídos para evitar efeitos locais intensos. Devem evitar-se concentrações que possam provocar efeitos corrosivos ou irritantes no tubo digestivo.

Duração do estudo

32. No caso dos roedores, normalmente a duração do estudo é de 24 meses, o que representa grande parte do tempo de vida dos animais utilizados. Consoante o tempo de vida dos animais da estirpe de espécie utilizada no estudo, este pode ser mais curto ou mais longo, mas é necessário justificá-lo. No caso de determinadas estirpes de ratinhos (por exemplo, AKR/J, C3H/J ou C57BL/6J), pode ser adequada uma duração do estudo de 18 meses. Seguem-se algumas orientações sobre a duração do estudo, o termo deste e a sobrevivência. Para mais orientações, nomeadamente no que respeita aos critérios para considerar a carcinogenicidade negativa com base na sobrevivência dos animais estudados, consultar o documento de orientações n.º 116 da OCDE, relativo à conceção e realização de estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (7).

— deve ponderar-se pôr termo ao estudo quando o número de sobreviventes do grupo exposto à dose mais baixa ou do grupo de controlo descer abaixo de 25 %,

— se apenas morrerem prematuramente devido a efeitos tóxicos animais do grupo exposto à dose mais elevada, não deve pôr-se termo ao estudo,

— a sobrevivência dos animais deve ser examinada separadamente para cada sexo,

— o estudo não deve prolongar-se além do estádio em que os dados dele extraíveis deixam de ser suficientes para validar uma avaliação estatística.

▼M4

EXAMES

33. Normalmente no início e no final de cada dia, incluindo fins de semana e feriados, devem verificar-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais. Verifica-se igualmente, uma vez por dia, se os animais têm sinais com importância toxicológica, tendo em conta, no caso da administração por sonda esofágica, o período previsto de efeitos mais acentuados após a administração do produto químico. Deve prestar-se especial atenção ao desenvolvimento de tumores, registando-se o tempo decorrido até ao aparecimento destes e o local, as dimensões, o aspeto e a progressão de cada tumor visível na observação macroscópica ou identificável por palpação.

Peso corporal, consumo de alimentos e de água, eficiência alimentar

34. Todos os animais devem ser pesados no início da exposição, pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Deve medir-se o consumo de alimentos e a eficiência alimentar pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, deve medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Pode ser útil medir o consumo de água também no caso dos estudos em que se verifiquem alterações do comportamento dos animais a esse nível.

Análises hematológicas e de bioquímica clínica e outras determinações

35. A fim de extrair um máximo de informações do estudo, sobretudo no que respeita ao modo de ação, fica ao critério do diretor do estudo proceder à colheita de amostras de sangue para análises hematológicas e de bioquímica clínica. Pode também ser útil efetuar análises de urina. Para mais orientações sobre o interesse da colheita dessas amostras num estudo de carcinogenicidade, consultar o documento de orientações n.º 116 (7). Se forem consideradas úteis, pode proceder-se à colheita de amostras de sangue para análises hematológicas e de bioquímica clínica, bem como de amostras de urina para as análises respetivas, quando das eutanásias intercalares (ver o ponto 20) e a, pelo menos, dez animais de cada sexo, por grupo, no termo do estudo. As amostras de sangue devem ser colhidas, sob anestesia, num ponto determinado a indicar, por exemplo, por punção cardíaca ou no seio retro-orbital. Se for necessário conservá-las, devem sê-lo em condições adequadas. Podem igualmente preparar-se esfregaços de sangue para exame, em especial se o órgão afetado for a medula óssea. Todavia, tem sido questionada (32) a utilidade deste exame para a avaliação do potencial cancerígeno/oncogénico.

PATOLOGIA

Autópsia macroscópica

36. Deve ser realizada a todos os animais estudados — exceto os animais sentinelas (ver o ponto 20) e outros animais satélites — uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Fica ao critério do diretor do estudo decidir em que casos é necessário autopsiar animais sentinelas ou outros animais satélites. A pesagem de órgãos normalmente não faz parte dos estudos de carcinogénese, dado que as alterações geriátricas e o desenvolvimento de tumores em fases avançadas diminuem a utilidade dessas pesagens. Todavia, estas pesagens podem ter muita importância nas avaliações baseadas na suficiência da prova, sobretudo no que respeita ao modo de ação. Se fizerem parte de estudos satélites, devem recolher-se estes dados o mais tardar um ano após o início do estudo.

▼M4

37. Os tecidos a seguir indicados devem conservar-se no meio de fixação mais adequado ao tipo de tecido em causa e ao exame histopatológico previsto (33) — os tecidos entre parênteses retos são facultativos:

todas as lesões macroscópicas	coração	pâncreas	estômago (pré-estômago, estômago glandular)
glândulas suprarrenais	íleo	glândulas paratiroides	[dentes]
aorta	jejuno	nervo periférico	testículos
encéfalo (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/ /protuberância anelar)	rins	hipófise	timo
cego	glândulas lacrimais (exo--orbitais)	próstata	tiroide
colo do útero	fígado	reto	[língua]
glândulas de coagulação	pulmões	glândulas salivares	traqueia
cólon	gânglios linfáticos (superficiais e profundos)	vesículas seminais	bexiga urinária
duodeno	glândulas mamárias (obrigatório no caso das fêmeas e, nos machos, se for claramente dissecável)	músculo esquelético	útero, incluindo o colo do útero
epidídimo	[vias respiratórias superiores, incluindo o nariz, os cornetos e os seios paranasais]	pele	[ureteres]
olhos (incluindo a retina)	esófago	medula espinal (a três níveis: cervical, mediotorácico e lombar)	[uretra]
[fémur com articulação]	[bolbo olfativo]	baço	vagina
vesícula biliar (exceto no caso do rato)	ovários	[esterno]	secção da medula óssea e/ou uma punção recente de medula óssea
glândulas de Harder			

No caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem conservar-se ambos. Os resultados clínicos ou outros podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem conservar-se também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indiciem que serão provavelmente afetados. Nos estudos por via dérmica, os órgãos a conservar são ainda os constantes da lista relativa à exposição por via oral, mas é essencial proceder igualmente à amostragem e à conservação de pele do local onde o produto químico em estudo foi aplicado. Nos estudos por inalação, a lista de tecidos do aparelho respiratório a conservar e a examinar deve seguir as recomendações dos capítulos B.8 e B.29 deste anexo. A lista de outros órgãos e tecidos a examinar neste caso (além dos tecidos do aparelho respiratório a conservar já especificados) é a estabelecida para a exposição por via oral.

▼M4

Histopatologia

38. A referência 33 contém orientações sobre as melhores práticas a seguir na realização de estudos de patologias toxicológicas. Os exames devem incidir, no mínimo, nos seguintes tecidos:

— todos os tecidos dos animais dos grupos de controlo e dos grupos expostos à dose mais elevada,

— todos os tecidos dos animais que morreram ou foram eutanasiados durante o estudo,

— todos os tecidos com anomalias macroscópicas, incluindo tumores,

— os tecidos que revelaram alterações histopatológicas atribuíveis à exposição do produto químico em estudo nos animais dos grupos expostos à dose mais elevada, de todos os animais de todos os outros grupos expostos a uma dose do produto químico,

— no caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem examinar-se ambos.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

39. Deve apresentar-se os dados por animal relativos a todos os parâmetros avaliados. Esses dados devem ainda ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais no início do ensaio, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados, a hora de cada morte ou eutanásia, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, a descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o momento do seu aparecimento e a sua duração e intensidade, o número de animais que apresentaram lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais que apresentaram cada tipo de lesão. Devem constar dos quadros de resumo dos dados as médias e os desvios-padrão (no caso dos dados contínuos) correspondentes aos animais que apresentaram lesões ou efeitos tóxicos, além do grau das lesões.

40. Os dados históricos de controlo podem ser úteis para a interpretação dos resultados do estudo, por exemplo, quando houver indicações de que os dados provenientes dos grupos de controlo em paralelo divergem significativamente de dados recentes referentes a animais de controlo da mesma colónia e da mesma unidade de ensaio. Caso sejam avaliados dados históricos de controlo, estes devem provir do mesmo laboratório, reportar-se a animais da mesma idade e estirpe e ter sido gerados nos cinco anos anteriores ao estudo em causa.

41. Quando pertinente, devem avaliar-se os resultados numéricos por um método estatístico corrente adequado. Os métodos estatísticos e os dados a analisar devem ser escolhidos no planeamento do estudo (ponto 9). Nessa escolha, devem prever-se os ajustamentos em função do grau de sobrevivência que se revelem necessários.

Relatório dos ensaios

42. Dados a constar do relatório dos ensaios:

Produto químico em estudo:

— natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas,

— dados de identificação,

▼M4

— proveniência,

— número de lote,

— boletim de análises químicas.

Veículo (se for o caso):

— justificação da escolha do veículo (se não for água).

Animais estudados:

— espécie e estirpe utilizadas e justificação da opção tomada,

— número, idade e sexo dos animais no início dos ensaios,

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.,

— peso de cada animal no início do ensaio.

Condições de realização dos ensaios:

— fundamentação da via de administração e das doses escolhidas,

— métodos estatísticos utilizados na análise dos dados, se for o caso,

— elementos relativos à formulação do produto químico em estudo/à incorporação do mesmo na dieta fornecida aos animais,

— dados analíticos relativos à concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação,

— via de administração e elementos relativos à administração do produto químico em estudo,

— no caso dos estudos por inalação: exposição unicamente nasal ou de corpo inteiro,

— doses reais (mg/kg de peso corporal/dia) e, se for caso disso, fator de conversão entre a concentração do produto químico em estudo na dieta ou na água de beber (mg/kg ou ppm) e a dose real,

— pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água.

Resultados (apresentar quadros de resumo dos dados e os dados por animal):

Informações gerais

— dados de sobrevivência,

— pesos corporais e alterações de peso corporal,

— consumo de alimentos, cálculos da eficiência alimentar (se efetuados) e consumo de água (se for caso disso),

— dados toxicocinéticos, se disponíveis,

— resultados oftalmoscópicos, se disponíveis,

— resultados hematológicos, se disponíveis,

— resultados de química clínica, se disponíveis.

▼M4

Resultados dos exames clínicos

— sinais de toxicidade,

— incidência (e, se quantificada, intensidade) das anomalias observadas,

— natureza, intensidade e duração dos sinais clínicos observados (reversíveis ou irreversíveis).

Dados das autópsias

— peso corporal terminal,

— peso de cada órgão (e relação com o peso corporal, se for caso disso),

— resultados das autópsias; incidência e intensidade das anomalias.

Histopatologia

— observação de efeitos histopatológicos não neoplásicos,

— observação de efeitos histopatológicos neoplásicos,

— correlação entre as observações macroscópicas e os resultados microscópicos,

— descrição pormenorizada dos resultados histopatológicos resultantes da exposição dos animais ao produto químico em estudo, incluindo a classificação de intensidade,

— relatórios do eventual exame das lâminas por pares especialistas.

Tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.

Discussão dos resultados, nomeadamente:

— discussão dos eventuais modelos,

— relações dose-resposta,

— dados históricos de controlo,

— análise dos dados disponíveis sobre modos de ação,

— determinação das doses de referência, do NOAEL e do LOAEL,

— importância para o ser humano.

Conclusões

REFERÊNCIAS:

(1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995). Documento de trabalho interno. Environment Directorate, OCDE, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

(3) Combes R.D., Gaunt, I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. *ATLA* 32:163-208.

(4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 40:145-191.

(5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206:437-445.

▼**M4**

(6) Capítulo B.27 deste anexo, "Ensaio de toxicidade oral subcrónica – Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias".

(7) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – segunda edição. Series on Testing and Assessment No. 116. Disponível no sítio Web público de *Test Guidelines* da OCDE (www.oecd.org/env/testguidelines).

(8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(9) Capítulo B.8 deste anexo, "Toxicidade subaguda por inalação: Estudo de 28 dias".

(10) Capítulo B.29 deste anexo, "Toxicidade subcrónica por inalação: Estudo de 90 dias".

(11) Capítulo B.9 deste anexo, "Toxicidade (dérmica) da dose repetida (28 dias)".

(12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. *Crit. Rev. in Toxicol.*, 36:793-801.

(13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., Fenner-Crisp P.A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:581-589.

(14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci.* 89:51-56.

(15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:591-653.

(16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36:1-7.

(17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36:9-35.

(18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36:37-68.

(19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36:69-98.

(20) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies. Series on Testing and Assessment No. 35; Series on Pesticides No. 14. ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.

(21) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

▼M4

(22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West, W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection. *Crit. Rev. Toxicol.* 37(9):729-837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran J.A. (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N., Lumley C.E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.

(25) Usui T., Griffiths S.A., Lumley C.E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. *In* D'Arcy POF & Harron DWG (eds.). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast, p. 279-284.

(26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect.* 105:1196-1203.

(27) Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (JO L 276 de 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council (1985). Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.

(32) Weingand K., *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 29:198-201.

(33) Crissman J., Goodman D., Hildebrandt P., *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32:126-131.

▼**M4**

Apêndice 1

DEFINIÇÃO

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M4

B.33. ESTUDOS COMBINADOS DE TOXICIDADE CRÓNICA E CARCINOGENICIDADE

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 453 (2009) da OCDE. O *Test Guideline* TG 453 inicial foi adotado em 1981. Entendeu-se necessário atualizar o método B.33 para dar conta da evolução recente no domínio do bem-estar animal e da regulamentação (1)(2)(3)(4)(5). A atualização do método B.33 decorreu paralelamente à revisão dos capítulos B.32 ("Estudos de carcinogenicidade") e B.30 ("Estudos de toxicidade crónica") deste anexo. Visa-se obter mais dados a partir dos animais utilizados nos estudos e dispor de mais elementos para a escolha das doses. Este método foi concebido para o ensaio de uma vasta gama de produtos químicos, nomeadamente pesticidas e produtos químicos industriais. Alguns aspetos e requisitos podem, porém, ser diferentes no caso dos produtos farmacêuticos (ver o documento de orientações "*Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals*", publicado pela Conferência Internacional de Harmonização).

2. Na sua maioria, os estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade são efetuados em roedores. Este método destina-se, portanto, a ser aplicado, preferencialmente, a estudos em espécies de roedores. Caso seja necessário efetuar estudos noutras espécies, os princípios e procedimentos descritos neste método e no capítulo B.27 deste anexo — "Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias" (6) — podem igualmente ser aplicados, com as adaptações necessárias e em observância das orientações do *Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (n.º 116) da OCDE (7).

3. As três vias principais de administração nos estudos de toxicidade crónica e carcinogenicidade são a via oral, a via dérmica e a via inalatória. A via de administração escolhida depende das características físico-químicas do produto químico em estudo e da via predominante de exposição humana. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a escolha da via de exposição.

4. Este método centra-se na exposição por via oral, que é a via habitualmente mais utilizada nos estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade. Embora possa também ser necessário efetuar estudos a longo prazo por via dérmica ou por inalação para avaliar o risco para a saúde humana e/ou isso possa mesmo ser exigido pela regulamentação aplicável, estas duas vias de exposição são bastante complexas do ponto de vista técnico e esses estudos têm de ser concebidos para cada caso concreto. Porém, no que diz respeito às recomendações relativas aos períodos de exposição, aos parâmetros clínicos e patológicos e a outros aspetos, o método aqui descrito para caracterização e avaliação da toxicidade crónica e da carcinogenicidade por administração oral pode constituir a base de um protocolo para estudos por inalação e/ou por via dérmica. A OCDE publicou orientações relativas ao estudo da administração de produtos químicos por inalação (7)(8) e por via dérmica (7). Para a conceção de estudos a longo prazo com exposição por via inalatória, recomenda-se especificamente a consulta dos capítulos B.8 (9) e B.29 (10) deste anexo e do documento de orientações da OCDE relativo a ensaios de toxicidade aguda por inalação (8). No caso dos ensaios por via dérmica, deve consultar-se o capítulo B.9 (11) deste anexo.

▼M4

5. Os estudos combinados de toxicidade crónica e carcinogenicidade fornecem informações sobre os perigos para a saúde que podem advir potencialmente da exposição repetida durante um período que pode abranger todo o tempo de vida da espécie utilizada. Estes estudos fornecem informações sobre os efeitos tóxicos do produto químico em causa, incluindo o potencial de carcinogenicidade, bem como indicações sobre os órgãos afetados e a possibilidade de acumulação. Podem igualmente servir para obter estimativas do nível sem observação de efeitos adversos ("*no observed adverse effect level*", NOAEL) para efeitos tóxicos e, no caso dos produtos cancerígenos não genotóxicos, para respostas tumorais, com base nas quais se podem estabelecer critérios de segurança para a exposição humana. Salienta-se a necessidade de um exame clínico cuidadoso dos animais, de modo a obter-se o máximo de informação possível.

6. Entre os objetivos dos estudos de toxicidade crónica e carcinogenicidade efetuados por este método contam-se os seguintes:

— identificação das propriedades cancerígenas do produto químico em estudo suscetíveis de aumentar a incidência de neoplasias ou a proporção de neoplasias malignas, ou de reduzir o tempo que as neoplasias demoram a surgir, comparativamente aos grupos de controlo em paralelo,

— identificação do tempo que as neoplasias demoram a surgir,

— identificação da toxicidade crónica de produtos químicos,

— identificação do órgão ou órgãos afetados pela toxicidade crónica e pela carcinogenicidade,

— caracterização de relações dose-resposta,

— determinação de níveis sem observação de efeitos adversos (NOAEL) ou ponto de partida para o estabelecimento de doses de referência,

— extrapolação de efeitos cancerígenos para doses baixas de exposição humana,

— previsão de efeitos de toxicidade crónica aos níveis da exposição humana,

— obtenção de dados para verificação de hipóteses relativas a modos de ação (2)(7)(12)(13)(14)(15).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. Antes de efetuar um estudo com vista à caracterização e avaliação da carcinogenicidade e da toxicidade crónica potenciais de um produto químico, o laboratório que efetuará os ensaios deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa, a fim de adaptar o estudo de modo a melhorar a eficiência da determinação das propriedades toxicológicas do mesmo e para minimizar o recurso a animais. É especialmente importante conhecer e ter em conta o modo de ação do agente cancerígeno suspeito (2)(7)(12)(13)(14)(15), dado que a conceção ótima do estudo pode ser diferente consoante o produto químico em causa seja ou não um agente cancerígeno/genotóxico reconhecido ou se suspeite ou não de que o possa ser. Para mais orientações sobre o modo de ação, consultar o documento de orientações n.º 116 (7).

8. Entre os elementos que podem ser úteis na conceção do estudo contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em causa, informações disponíveis sobre o modo de ação, resultados de ensaios de toxicidade (incluindo de genotoxicidade) *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana, dados (Q)SAR — "*(quantitative) structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e dados de mutagenicidade/genotoxicidade, carcinogenicidade e outros dados toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins, dados toxicocinéticos disponíveis (dados cinéticos associados a uma dose única ou a doses múltiplas) e dados

▼M4

provenientes de outros estudos com exposição repetida. Só deve proceder-se à determinação da toxicidade crónica e da carcinogenicidade depois de obtidos dados de toxicidade preliminares provenientes de estudos de toxicidade com repetição da dose administrada durante 28 e/ou 90 dias. Os ensaios a curto prazo da promoção do desencadeamento de cancros também podem fornecer informações úteis. Deve ponderar-se uma abordagem faseada dos ensaios de carcinogenicidade no âmbito da avaliação global dos potenciais efeitos adversos na saúde do produto químico em estudo (16)(17)(18)(19).

9. Antes de iniciar o estudo, devem escolher-se, com base no plano experimental e nos objetivos estabelecidos, os métodos estatísticos mais adequados para a análise dos resultados. Entre outros aspetos a considerar, é necessário determinar se o tratamento estatístico deverá contemplar ajustamentos em função do grau de sobrevivência, a análise do risco tumoral acumulado em função do tempo de sobrevivência e a análise do tempo que os tumores demorar a surgir, bem como que tipo de análise deve efetuar-se no caso da morte prematura de todos os animais de um ou mais grupos. Para orientações sobre as análises estatísticas mais adequadas e informação sobre as referências bibliográficas fundamentais dos métodos estatísticos internacionalmente reconhecidos, deve consultar-se o documento de orientações n.º 116 (7), assim como o documento de orientações n.º 35, relativo à análise e avaliação de estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (20).

10. Ao realizar um estudo de carcinogenicidade, recomenda-se que sejam sempre seguidos os princípios e considerações orientadores enunciados no *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* da OCDE (21), nomeadamente os expressos no ponto 62 do mesmo, cuja tradução é a seguinte: *"Nos estudos com repetição da dose administrada, se um animal evidenciar sinais clínicos progressivos da deterioração do seu estado, deve tomar-se uma decisão com conhecimento de causa sobre se deve ou não ser eutanasiado. Para isso, deve ponderar-se, nomeadamente, o valor das informações que seriam obtidas no caso de o animal continuar integrado no estudo, relativamente ao estado geral do mesmo. Caso se decida manter o animal no estudo, deve aumentar-se, tanto quanto necessário, a frequência dos exames que lhe são efetuados. Também é possível, sem prejudicar a finalidade do ensaio, suspender temporariamente a administração do produto químico em estudo – se isso reduzir a dor ou sofrimento do animal – ou reduzir a dose administrada".*

11. Para orientações pormenorizadas sobre os princípios aplicáveis à escolha das doses para estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade e uma discussão dos mesmos, recomenda-se a consulta do documento de orientações n.º 116 (7) e das publicações com as referências 22 e 23 do International Life Sciences Institute. A estratégia de base para escolha das doses depende do objetivo ou objetivos principais do estudo (ver o ponto 6). Para escolher doses adequadas, importa estabelecer um equilíbrio entre, por um lado, a identificação dos perigos em jogo e, por outro, a caracterização e importância das respostas às doses reduzidas. Este equilíbrio é especialmente necessário quando se realizam estudos combinados de toxicidade crónica e de carcinogenicidade.

12. Deve ponderar-se a oportunidade de efetuar este estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade, em vez de efetuar separadamente um estudo de toxicidade crónica (capítulo B.30 deste anexo) e um estudo de carcinogénese (capítulo B.32 deste anexo). O estudo combinado é mais favorável, em termos de tempo e de custos e de alguma redução do recurso a animais, do que dois estudos distintos e não prejudica a qualidade dos dados obtidos na etapa de toxicidade crónica nem na etapa de carcinogenicidade. Ao efetuar um estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade, é, porém, necessário prestar especial atenção aos princípios relativos à escolha das doses (pontos 11 e 22 a 26). Reconhece-se, porém, que determinadas regulamentações podem exigir a realização de estudos separados. Para mais orientações sobre a otimização dos estudos combinados de toxicidade crónica e de carcinogenicidade, ao nível das possibilidades de redução do número de animais utilizados e através da racionalização dos procedimentos experimentais, consultar o documento de orientações n.º 116 (7).

▼M4

13. No final do capítulo e no documento de orientações n.º 116 (7) define-se alguns conceitos utilizados neste método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

14. O estudo consiste em duas etapas em paralelo, uma relativa à toxicidade crónica e outra relativa à carcinogenicidade (ver as durações respetivas nos pontos 34 e 35). Normalmente, administra-se o produto químico por via oral, embora a via inalatória ou a via dérmica também possam ser adequadas. Na etapa relativa à toxicidade crónica, administra-se diariamente o produto químico em estudo a vários grupos de animais, em doses crescentes de grupo para grupo, normalmente durante doze meses, embora possam escolher-se períodos mais longos ou mais curtos em função das exigências da regulamentação (ver o ponto 34). Escolhe-se a duração do estudo de modo a ser suficientemente longa para que os eventuais efeitos de toxicidade acumulada se manifestem, mas sem que sejam perturbados por alterações ligadas ao envelhecimento dos animais. Pode estar prevista a realização de uma ou mais eutanásias intercalares, por exemplo, após três ou seis meses. Nesse caso, pode aumentar-se o número de grupos de animais em conformidade (ver o ponto 20). Na etapa relativa à carcinogenicidade, administra-se diariamente o produto químico em estudo a vários grupos de animais, durante grande parte do tempo de vida dos animais. Verifica-se atentamente, relativamente a ambas as etapas, se os animais evidenciam sinais de toxicidade ou se neles estão a desenvolver-se lesões neoplásicas. Autopsia-se os animais que morrem ou são eutanasiados durante os ensaios. No final dos ensaios, eutanasia-se e autopsia-se os animais sobreviventes.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

15. Este método trata, em especial, da caracterização e avaliação da toxicidade crónica e da carcinogenicidade em roedores (ver o ponto 2). Pode ponderar-se o recurso a outras espécies se os dados disponíveis indicarem que as espécies em causa permitem prever melhor os efeitos na saúde humana. É necessário justificar a escolha da espécie. Embora possa recorrer-se a outras espécies de roedores, como o ratinho, a espécie preferida é o rato. Se bem que os estudos de carcinogenicidade no ratinho possam ser de pouca utilidade (24)(25)(26), alguns programas obrigatórios continuam a exigir ensaios de carcinogenicidade nessa espécie, a menos que se demonstre que, do ponto de vista científico, este estudo não é necessário. O rato e o ratinho constituem os modelos experimentais preferidos devido à sua longevidade relativamente reduzida, à sua utilização generalizada em estudos farmacológicos e toxicológicos, à sua sensibilidade à indução de tumores e à disponibilidade de estirpes suficientemente caracterizadas destas espécies. Em consequência disto, dispõe-se de numerosos dados sobre a fisiologia e patologia destes animais. Se forem exigidos estudos de toxicidade crónica e carcinogenicidade em espécies que não sejam de roedores, a conceção e realização desses estudos deve basear-se nos princípios descritos no presente método e no capítulo B.27 deste anexo — "Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias" (6). O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a escolha da espécie e da estirpe.

16. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. De preferência, o estudo combinado de toxicidade crónica e carcinogenicidade deve ser realizado com animais da mesma estirpe e proveniência que os utilizados no estudo ou estudos preliminares mais curtos de toxicidade. Todavia, se os animais da estirpe e proveniência em questão não corresponderem reconhecidamente aos critérios normalmente aceites de sobrevivência em estudos de longo prazo — ver o documento de orientações n.º 116 (7) —, deve ponderar-se a utilização de uma estirpe animal cuja taxa de sobrevivência no estudo a longo prazo seja aceitável. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas.

▼M4

Condições de alojamento e alimentação

17. Os animais podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo. É necessário justificar cientificamente a opção pelo alojamento individual (27)(28)(29). As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 30 %, no mínimo, e um valor máximo que, preferencialmente, não deve exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições. A dieta deve satisfazer as necessidades nutricionais da espécie estudada. Os teores de contaminantes da dieta — resíduos de pesticidas, poluentes orgânicos persistentes, fitoestrogénios, metais pesados, micotoxinas e outros — podem influenciar os resultados dos ensaios e devem ser os mais baixos possíveis. É necessário obter periodicamente dados analíticos relativos aos teores de nutrientes e de contaminantes da dieta, pelo menos no início do estudo e quando se muda de lote. Estes dados devem constar do relatório final. É igualmente necessário dispor de dados analíticos da água de beber utilizada no estudo. Quando o produto químico em estudo é administrado por via alimentar, a escolha da dieta pode ser influenciada pela necessidade de nela misturar convenientemente esse produto químico e de satisfazer simultaneamente as exigências nutricionais dos animais.

Preparação dos animais

18. Os animais utilizados devem ser saudáveis e ter sido aclimatados às condições laboratoriais durante, pelo menos, sete dias e não devem ter participado em experiências anteriores. No caso dos roedores, a administração do produto químico em estudo deve iniciar-se logo que possível após o desmame e a aclimatação, de preferência antes de os animais completarem oito semanas. É necessário caracterizar a espécie, a estirpe, a proveniência, o sexo, o peso e a idade dos animais utilizados no estudo. No início do estudo, as diferenças de peso entre os animais de cada sexo devem ser mínimas, não se desviando mais de 20 % do peso médio de todos os animais de cada sexo nele utilizados. Distribuem-se aleatoriamente os animais pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. Depois da distribuição aleatória dos animais, a média de peso corporal não deve diferir significativamente de grupo para grupo de animais do mesmo sexo. Se houver diferenças com significado estatístico, os animais devem, se possível, ser redistribuídos aleatoriamente. Deve atribuir-se a cada animal um número de identificação único, com o qual o animal seja identificado por tatuagem, implantação de *microchip* ou outro método adequado.

PROCEDIMENTO

Número e sexo dos animais

19. Devem ser utilizados animais de ambos os sexos. O número de animais utilizados deve ser suficiente para uma avaliação biológica e estatística aprofundada. No caso dos roedores, cada grupo de dose (ver o ponto 22) e grupo de controlo em paralelo destinado à etapa de carcinogenicidade do estudo não deve, portanto, ter menos de 50 animais de cada sexo. Consoante a finalidade do estudo, poderá aumentar-se a representatividade estatística das principais estimativas distribuindo desigualmente os animais pelos vários grupos de dose, constituindo grupos com mais de 50 animais para as doses mais baixas, por exemplo, para estimar o potencial cancerígeno a doses baixas. Todavia, importa ter presente que um aumento ligeiro do tamanho dos grupos aumenta relativamente pouco a representatividade estatística do estudo. No caso dos roedores, cada grupo de dose (ver o ponto 22) e grupo de controlo em paralelo destinado à etapa de toxicidade

▼M4

crónica do estudo deve ser constituído por, pelo menos, 10 animais de cada sexo, número que é inferior ao utilizado no estudo de toxicidade crónica (capítulo B.30 deste anexo). Todavia, na interpretação dos dados provenientes de grupos com menos animais na etapa de toxicidade crónica deste estudo combinado, são tidos em conta os dados provenientes da etapa de carcinogenicidade, na qual os efetivos são maiores. Nos estudos com ratinhos, pode ser necessário reforçar o número de animais em cada grupo exposto na etapa de toxicidade crónica, para poder realizar todas as determinações hematológicas previstas. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a conceção estatística do estudo e a escolha das doses para maximizar a representatividade estatística.

Eutanásias intercalares, grupo satélite e animais sentinelas

20. Caso se justifique do ponto de vista científico, pode prever-se a realização de eutanásias intercalares – por exemplo, ao fim de seis meses, na etapa de toxicidade crónica — para obter informações sobre a evolução das alterações neoplásicas, bem como dados mecanísticos. Caso já se disponha desses dados, obtidos em estudos de toxicidade por dose repetida realizados com o produto químico em causa, as eutanásias em questão podem não se justificar cientificamente. Os animais utilizados na etapa de toxicidade crónica do estudo — que, normalmente, se prolonga por doze meses (ponto 34) — fornecem dados equiparados aos de uma eutanásia intercalar para a etapa de carcinogenicidade do mesmo, reduzindo-se assim o número total de animais utilizados. Podem também prever-se grupos satélites na etapa de toxicidade crónica do estudo, para verificar a reversibilidade de alterações toxicológicas induzidas pelo produto químico em estudo. Nesse caso, os grupos satélite podem restringir-se à dose mais elevada em estudo e aos grupos de controlo. Pode prever-se um grupo de animais sentinelas (habitualmente cinco animais de cada sexo) para verificar, se necessário, o aparecimento de doenças durante o estudo (30). O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a maneira de, minimizando o número total de animais utilizados, incluir no estudo eutanásias intercalares e animais satélites e sentinelas.

21. Caso esteja prevista no estudo a existência de animais satélites e/ou a realização de eutanásias intercalares, o número de animais a utilizar com essas finalidades em cada grupo de dose é normalmente de dez de cada sexo. Nesse caso, o número total de animais utilizado no estudo deve ser aumentado no número de animais a eutanasiar antes da conclusão do mesmo. Normalmente, os animais satélites e os animais sujeitos à eutanásia intercalar devem ser objeto do mesmo exame, nomeadamente peso corporal, consumo de alimentos e de água, análises hematológicas e de bioquímica clínica e exames patológicos, que os animais participantes na etapa de toxicidade crónica do estudo principal, embora também possa prever-se (no caso dos grupos com destino a eutanásia intercalar) que as determinações se limitem a parâmetros fundamentais específicos, por exemplo, de neurotoxicidade ou de imunotoxicidade.

Grupos de dose e dosagens

22. O documento de orientações n.º 116 (7) contém orientações relativas a todos os aspetos relacionados com a escolha das doses e os intervalos entre estas. Devem ser utilizados pelo menos três doses e um controlo em paralelo, para as etapas de toxicidade crónica e de carcinogenicidade. As doses baseiam-se, normalmente, nos resultados de estudos exploratórios das doses ou de estudos de dose repetida por períodos mais curtos e devem atender aos dados toxicológicos e toxicocinéticos disponíveis sobre o produto químico em estudo ou produtos químicos afins.

▼M4

23. Se for de prever que o ensaio, na etapa de toxicidade crónica do estudo, de uma dose não inferior a 1 000 mg/kg de peso corporal/dia não provoque efeitos adversos, pode considerar-se que não é necessário efetuar um estudo completo com três doses. Esta decisão deve basear-se nos resultados de estudos preliminares e, tendo em conta dados referentes a produtos químicos estruturalmente afins, na provável ausência de efeitos tóxicos. Nesses casos, pode justificar-se um limite de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia, exceto se os dados relativos à exposição humana aconselharem o ensaio de uma dose superior.

24. A menos que tal dose esteja limitada pelas características físico-químicas ou pelos efeitos biológicos do produto químico em estudo, deve escolher-se para dose mais elevada o nível que permita identificar os principais órgãos afetados e os efeitos tóxicos principais sem causar sofrimento, efeitos tóxicos intensos, morbidez nem mortalidade. Normalmente, escolhe-se para dose mais elevada uma dose que induza efeitos tóxicos, evidenciados, por exemplo, por uma redução (aproximadamente de 10 %) do ganho de peso corporal. Todavia, consoante os objetivos do estudo (ver o ponto 6), pode escolher-se uma dose máxima inferior à que evidencia efeitos tóxicos, por exemplo, se essa dose induzir um efeito adverso preocupante, mas com pouca influência na longevidade ou no peso corporal dos animais.

25. Podem escolher-se doses e intervalos entre doses que permitam estabelecer uma relação dose-resposta e, consoante o modo de ação do produto químico em estudo, determinar um NOAEL ou outro resultado pretendido do estudo, por exemplo, uma dose de referência (ver o ponto 27). Entre os fatores a ter em conta na escolha das doses mais baixas, contam-se o declive esperado da curva dose-resposta, as doses às quais podem ocorrer alterações importantes ao nível metabólico ou do modo da ação tóxica, o nível ao qual se prevê a ocorrência de um limiar e o nível ao qual se prevê fixar o ponto de partida de extrapolações para doses mais baixas. O objetivo principal de um estudo combinado de carcinogenicidade e de toxicidade crónica é obter informações destinadas à avaliação do risco de carcinogenicidade, sendo a recolha de dados relativos à toxicidade crónica um objetivo normalmente secundário. É importante ter isto presente ao escolher as doses e os intervalos entre doses para o estudo a realizar.

26. O intervalo entre as doses depende dos objetivos do estudo e das características do produto químico em estudo e não pode ser particularizado neste método. Contudo, a utilização de intervalos definidos por um fator de 2 a de 4 entre doses consecutivas dá frequentemente bons resultados nestes ensaios, sendo muitas vezes melhor ensaiar um quarto grupo do que recorrer a intervalos muito grandes (por exemplo, mais do que um fator de 6 a 10) entre as dosagens. Em geral, são de evitar fatores superiores a 10. Caso contrário, é necessário justificá-los.

27. Conforme se explica mais em pormenor no documento de orientações n.º 116 (7), entre os aspetos a ter em conta na escolha das doses contam-se os seguintes:

— relações não lineares ou pontos de inflexão conhecidos ou de que se suspeite na curva dose-resposta,

— aspetos toxicocinéticos e doses às quais ocorra, ou não ocorra, indução metabólica, saturação ou não linearidade entre as doses externas e as doses internas,

— lesões precursoras, marcadores de efeitos ou indicadores de processos biológicos fundamentais subjacentes em curso,

▼M4

— aspetos fundamentais (ou de que se suspeite) do modo de ação, tais como as doses às quais começam a manifestar-se efeitos citotóxicos, os níveis hormonais são perturbados, os mecanismos homeostáticos colapsam, etc.,

— regiões da curva dose-resposta que necessitam de estimativas especialmente rigorosas, por exemplo, perto da dose de referência prevista ou da dose à qual se suspeite corresponder um limiar,

— níveis previstos de exposição humana, sobretudo na escolha das doses baixas e intermédias.

28. O grupo de controlo deve ser um grupo não exposto ao produto químico em estudo ou, se for usado um veículo para administrar o produto químico, um grupo de controlo do veículo. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos ensaiados. Caso se utilize um veículo, o grupo de controlo deve receber o volume máximo de veículo utilizado nos grupos expostos ao produto químico em estudo. Se o produto químico for administrado por via da dieta e reduzir significativamente a quantidade desta ingerida por lhe conferir menor palatabilidade, um grupo de controlo adicional alimentado do mesmo modo, em paralelo, pode constituir um grupo de controlo mais adaptado.

Preparação das doses e administração do produto químico em estudo

29. O produto químico em estudo é normalmente administrado por via oral, através da dieta ou da água de beber ou por intermédio de uma sonda esofágica. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre vias e métodos de administração. A via e o método de administração dependem do objetivo do estudo, bem como das propriedades físico-químicas e biodisponibilidade do produto químico em causa e da via e do método de exposição humana predominantes. É necessário fundamentar a via e o método de administração escolhidos. Por razões de bem-estar animal, normalmente só deve optar-se pela utilização de uma sonda esofágica no caso dos agentes relativamente aos quais a via oral e este método de administração representem razoavelmente a exposição humana potencial (por exemplo, através da ingestão de produtos farmacêuticos). No caso dos produtos químicos ingeridos com os alimentos ou disseminados no ambiente, nomeadamente pesticidas, a administração habitual é por incorporação na dieta ou na água de beber. Todavia, para outros cenários – caso da exposição profissional –, pode justificar-se a administração por outras vias.

30. Se necessário, pode suspender-se ou dissolver-se o produto químico em estudo num veículo apropriado. Devem ser tidos em conta as seguintes características que se justifiquem do veículo e de outros aditivos: efeitos na absorção, na distribuição, no metabolismo ou na retenção do produto químico em causa, efeitos nas propriedades químicas do produto químico em estudo suscetíveis de alterarem as características tóxicas do mesmo e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais. Recomenda-se que, sempre que possível, a primeira opção seja uma solução ou suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode optar-se por uma solução ou emulsão num óleo (por exemplo, em óleo de milho); em último caso, poderá recorrer-se a uma solução noutro veículo. Se o veículo utilizado não for água, é necessário conhecer as suas características de toxicidade. Deve dispor-se de informações sobre a estabilidade do produto químico em estudo e a homogeneidade das soluções ou rações de dosagem (consoante o caso) nas condições de administração (por exemplo, por via da dieta).

31. É importante assegurar que a quantidade de um produto químico em estudo administrada através da dieta ou da água de beber não interfere nas exigências normais de nutrição nem no equilíbrio hídrico. No caso dos estudos de toxicidade a longo prazo nos quais o produto químico seja administrado pela via alimentar, a concentração deste nos alimentos não deve, normalmente, exceder 5 % da ração total, a fim de evitar desequilíbrios nutricionais. Se o produto químico em estudo for administrado por via da dieta, pode optar-se por concentrações constantes nesta (mg/kg de alimentos ou ppm) ou por doses constantes em relação ao peso corporal do animal (mg/kg de peso corporal), calculadas semanalmente. Deve indicar-se a opção tomada.

▼M4

32. Em caso de administração por via oral, os animais recebem uma dose quotidiana (sete dias por semana) do produto químico em estudo, ao longo de 12 meses (na etapa de toxicidade crónica) ou de 24 meses (na etapa de carcinogenicidade) — ver também os pontos 33 e 34. É necessário justificar qualquer outro regime de dosagem (por exemplo, cinco dias por semana). Em caso de administração por via dérmica, os animais são normalmente expostos ao produto químico em estudo durante, pelo menos, seis horas por dia, sete dias por semana, conforme se descreve no capítulo B.9 (11) deste anexo, ao longo de 12 meses (na etapa de toxicidade crónica) ou de 24 meses (na etapa de carcinogenicidade). A exposição por via inalatória é efetuada durante seis horas por dia, sete dias por semana. Todavia, caso se justifique, também podem expor-se os animais durantecinco dias por semana. O período de exposição neste caso é normalmente de 12 meses (na etapa de toxicidade crónica) ou de 24 meses (na etapa de carcinogenicidade). Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Se a duração da exposição for inferior a seis horas por dia, é necessário fundamentá-lo. Ver também o capítulo B.8 (9) deste anexo.

33. A administração do produto químico aos animais por meio de uma sonda esofágica deve efetuar-se à mesma hora do dia por meio de um tubo estomacal ou de uma cânula de intubação adequada. Normalmente, administra-se a dose diária de uma só vez. Porém, se o produto químico for, por exemplo, um irritante local, pode repartir-se a mesma dose diária por dois momentos. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal e deve ser o mínimo possível. No caso dos roedores, normalmente não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal (31). Para minimizar diferenças entre volumes administrados, devem ser efetuados ajustes nas concentrações, de forma que o volume seja o mesmo para todas as doses. Excetuam-se os produtos químicos potencialmente corrosivos ou irritantes, que têm de ser diluídos para evitar efeitos locais intensos. Devem evitar-se concentrações que possam provocar efeitos corrosivos ou irritantes no tubo digestivo.

Duração do estudo

34. Embora o período de exposição e a etapa de toxicidade crónica deste estudo se prolonguem, normalmente, por 12 meses, este método também está adaptado e pode aplicar-se a estudos mais curtos (por exemplo, seis ou nove meses) ou mais longos (por exemplo, 18 ou 24 meses), consoante o exija a regulamentação pertinente ou por razões mecanísticas determinadas. Se o período de exposição não for de 12 meses, é necessário fundamentá-lo, sobretudo se a duração da exposição for mais curta. A exposição de todos os grupos que participam nesta etapa termina no momento previsto para as avaliações de toxicidade crónica e de patologias não neoplásicas. Os grupos satélites incluídos para verificar a reversibilidade de alterações toxicológicas induzidas pelo produto químico em estudo devem manter-se sem dosagem após o termo da exposição, durante um período não inferior a quatro semanas e não superior a um terço da duração total do estudo.

35. No caso dos roedores, a duração da etapa de carcinogenicidade deste estudo é normalmente de 24 meses, o que representa grande parte do tempo de vida dos animais utilizados. Consoante o tempo de vida dos animais da estirpe de espécie utilizada no estudo, este pode ser mais curto ou mais longo, mas é necessário justificá-lo. No caso de determinadas estirpes de ratinhos (por exemplo, AKR/J, C3H/J ou C57BL/6J), pode ser adequada uma duração do estudo de 18 meses. Seguem-se algumas orientações sobre a duração do estudo, o termo deste e a sobrevivência. Para mais orientações, nomeadamente no que respeita aos critérios para considerar a carcinogenicidade negativa com base na sobrevivência dos animais estudados, consultar o documento de orientações n.º 116.

▼M4

— deve ponderar-se pôr termo ao estudo quando o número de sobreviventes do grupo exposto à dose mais baixa ou do grupo de controlo descer abaixo de 25 %.

— se apenas morrerem prematuramente devido a efeitos tóxicos animais do grupo exposto à dose mais elevada, não deve pôr-se termo ao estudo.

— a sobrevivência dos animais deve ser examinada separadamente para cada sexo.

— o estudo não deve prolongar-se além do estádio em que os dados dele extraíveis deixam de ser suficientes para validar uma avaliação estatística.

EXAMES (ETAPA DE TOXICIDADE CRÓNICA)

36. Normalmente no início e no final de cada dia, incluindo fins de semana e feriados, deve verificar-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais. Pelo menos uma vez por dia, deve efetuar-se um exame clínico geral, de preferência sempre à(s) mesma(s) hora(s) e, no caso da administração por sonda esofágica, tendo em conta o período previsto de efeitos mais acentuados após a administração do produto químico.

37. Deve efetuar-se um exame clínico aprofundado a cada animal pelo menos uma vez antes da primeira exposição (para poder fazer depois comparações com o estado inicial do animal), no final da primeira semana do estudo e, a partir daí, mensalmente. Os exames devem respeitar um protocolo que minimize as variações entre quem os realiza e não faça depender os resultados do grupo examinado. Estes exames devem ser realizados fora das gaiolas, de preferência num recinto normalizado e sempre à mesma hora. Os resultados destes exames devem ser cuidadosamente registados, de preferência por recurso a um sistema de pontuação claramente definido pelo laboratório em causa. Deve zelar-se por que as condições de exame sejam o mais constantes possível. Entre os sinais a registar contam-se alterações da pele, da pelagem, dos olhos e das mucosas e a ocorrência de secreções, excreções ou reações neurovegetativas (por exemplo, lacrimação, horripilação, alterações da dimensão pupilar ou respiração anormal). Deve também registar-se qualquer alteração da maneira de o animal se mover, da postura e da reação à manipulação, bem como a ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e de comportamentos estereotipados (por exemplo, atos de higiene repetitivos ou movimentação repetitiva em círculo) ou estranhos (automutilação, movimentação para trás, etc.) (32).

38. Recorrendo a um oftalmoscópio ou a dispositivo equivalente, efetua-se um exame oftalmológico a cada animal antes da primeira administração do produto químico em estudo. No termo do estudo, deve efetuar-se este exame de preferência a todos os animais, mas pelo menos aos dos grupos expostos à dose mais elevada e dos grupos de controlo. Se forem detetadas alterações oculares atribuíveis à exposição ao produto químico em estudo, devem examinar-se todos os animais. Se a análise estrutural ou outros elementos indiciarem efeitos tóxicos ao nível ocular, deve aumentar-se a frequência dos exames oculares.

39. No caso dos produtos químicos que tenham revelado potencial de indução de efeitos neurotóxicos em estudos anteriores de toxicidade por dose repetida a 28 dias e/ou a 90 dias, poderá, a título facultativo, verificar-se a reatividade sensorial a diversos tipos de estímulos (32) — por exemplo, estímulos auditivos, visuais ou propriocetivos (33)(34)(35) — e avaliar-se a força de preensão (36) e a atividade motora (37), antes de iniciar o estudo e, a partir daí, de três em três meses, até aos doze meses, inclusive, bem como no termo do estudo (se for além de doze meses). As referências indicadas contêm mais informações sobre a maneira de proceder em cada caso, embora possam adotar-se procedimentos distintos dos nelas descritos.

▼M4

40. No caso dos produtos químicos que tenham revelado potencial de indução de efeitos imunotóxicos em estudos anteriores de toxicidade por dose repetida a 28 dias e/ou a 90 dias, poderá, a título facultativo, aprofundar-se a investigação deste parâmetro no termo do estudo.

Peso corporal, consumo de alimentos e de água, eficiência alimentar

41. Todos os animais devem ser pesados no início da exposição, pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Deve medir-se o consumo de alimentos e a eficiência alimentar pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, deve medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Pode ser útil medir o consumo de água também no caso dos estudos em que se verifiquem alterações do comportamento dos animais a esse nível.

Análises hematológicas e de bioquímica clínica

42. Nos estudos com roedores, devem ser efetuadas análises hematológicas a todos os animais estudados (dez machos e dez fêmeas de cada grupo) aos três, seis e 12 meses e no termo do estudo (se for além de 12 meses). No caso dos ratinhos, a realização das análises hematológicas necessárias pode exigir o recurso a animais satélites (ver o ponto 19). No caso dos estudos em que não sejam utilizados roedores, colhem-se amostras num número mais reduzido de animais (por exemplo, se a espécie utilizada for o cão, quatro animais de cada sexo, por grupo) em estádios intermédios e no termo do estudo, tal como se indicou para os roedores. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros hematológicos, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses, tanto no caso dos roedores como de outras espécies. As amostras de sangue devem ser colhidas, sob anestesia, num ponto determinado a indicar, por exemplo, por punção cardíaca ou no seio retro-orbital.

43. Devem ser efetuadas as seguintes análises (38): contagem total de leucócitos, fórmula leucocitária, contagem de eritrócitos, contagem de plaquetas, concentração de hemoglobina, hematócrito (volume celular sanguíneo após centrifugação), volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada. Se necessário, em função da toxicidade do produto químico em estudo, poderão analisar-se outros parâmetros hematológicos, tais como os corpos de Heinz e outras anomalias morfológicas dos eritrócitos ou a meta-hemoglobina. Em termos gerais, deve adotar-se uma perspetiva de flexibilidade, dependendo dos efeitos observados e/ou previstos do produto químico em causa. Se este tiver efeitos no sistema hematopoiético, pode ser útil efetuar também a contagem de reticulócitos e uma citologia da medula óssea, embora estas análises não sejam sistematicamente necessárias.

44. Com a mesma cronologia especificada para as análises hematológicas, Devem ser efetuadas análises de bioquímica clínica a amostras de sangue colhidas em todos os animais estudados (dez machos e dez fêmeas de cada grupo), para determinar os principais efeitos tóxicos nos tecidos, nomeadamente ao nível dos rins e do fígado. No caso dos ratinhos, a realização das necessárias análises de bioquímica clínica pode exigir o recurso a animais satélites. No caso dos estudos em que não sejam utilizados roedores, colhem-se amostras num número mais reduzido de animais (por exemplo, se a espécie utilizada for o cão, quatro animais de cada sexo, por grupo) em estádios intermédios e no termo do estudo, tal como se indicou para os roedores. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros de bioquímica

▼M4

clínica, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses, tanto no caso dos roedores como de outras espécies. Recomenda-se o jejum dos animais (exceto dos ratinhos) durante a noite, antes da colheita das amostras de sangue ([1]). Devem ser efetuadas as seguintes análises (38): glucose, ureia (azoto ureico), creatinina, proteínas totais, albumina, cálcio, sódio, potássio, colesterol total, pelo menos duas análises reveladoras de efeitos hepatocelulares (alanina-aminotransferase, aspartato-aminotransferase, glutamate-desidrogenase, ácidos biliares totais) (39) e, pelo menos, duas análises reveladoras de efeitos hepatobiliares (fosfatase alcalina, gama-glutamil-transferase, 5'-nucleotidase, bilirrubina total, ácidos biliares totais) (39). Se necessário, em função da toxicidade do produto químico em estudo, poderão analisar-se outros parâmetros de química clínica, tais como a colinesterase, hormonas específicas e os triglicéridos em jejum. Em termos gerais, deve adotar-se uma perspetiva de flexibilidade, dependendo dos efeitos observados e/ou previstos do produto químico em causa.

45. Devem ser efetuadas análises de urina a todos os animais estudados (dez machos e dez fêmeas de cada grupo), em amostras colhidas com a mesma cronologia especificada para as análises hematológicas e de química clínica. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros analisados na urina, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses. Uma recomendação de peritos relativa a estudos de patologia clínica (38) inclui a seguinte lista de parâmetros: aspeto, volume, osmolalidade ou densidade, pH, proteínas totais e glucose. Podem também determinar-se os seguintes parâmetros: corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e sangue oculto. Pode ser necessário recorrer ainda a outros parâmetros para investigar melhor os efeitos observados.

46. Em geral, considera-se que, nos estudos em cães, é necessário determinar os valores de base dos parâmetros hematológicos e de bioquímica clínica antes de iniciar a exposição dos animais, o mesmo não sucedendo, porém, no caso dos estudos em roedores (38). Se os dados de base históricos (ver o ponto 58) forem inadequados, pode, no entanto, ser necessário determinar os dados em falta.

PATOLOGIA

Autópsia macroscópica

47. Normalmente, deve ser realizada a todos os animais estudados uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Todavia, pode igualmente prever-se que (no caso dos grupos com destino a eutanásia intercalar e dos grupos satélites) as determinações se limitem a parâmetros fundamentais específicos, por exemplo, de neurotoxicidade ou de imunotoxicidade (ver o ponto 21). Não é necessário autopsiar esses animais nem aplicar-lhes os procedimentos descritos nos pontos seguintes. Fica ao critério do diretor do estudo decidir em que casos é necessário autopsiar animais sentinelas.

([1]) No caso de algumas determinações no soro e no plasma, nomeadamente da glucose, é aconselhável que os animais jejuem durante a noite. O principal motivo deste recomendação reside no facto de que a maior variabilidade dos resultados que inevitavelmente ocorreria se os animais não jejuassem poderia ocultar efeitos subtis e dificultar as interpretações. No entanto, por outro lado, o jejum durante a noite pode interferir no metabolismo geral dos animais, e, particularmente nos estudos realizados com administração pela via alimentar, perturbar a exposição diária ao produto químico em estudo. Os animais devem ser todos avaliados no mesmo estado fisiológico, pelo que é preferível programar as avaliações pormenorizadas e as avaliações neurológicas para um dia diferente do da colheita das amostras para as análises de bioquímica clínica.

▼M4

48. Deve determinar-se o peso dos órgãos de cada animal, com exceção dos excluídos no ponto 47. Removem-se convenientemente os tecidos aderentes às glândulas suprarrenais, ao encéfalo, aos epidídimos, ao coração, aos rins, ao fígado, aos ovários, ao baço, aos testículos, à tiroide (com as glândulas paratiroides, sendo a pesagem efetuada depois da fixação) e ao útero de todos os animais (exceto os moribundos e/ou os que sejam eutanasiados durante o estudo) e pesa-se cada um destes ainda húmido o mais rapidamente possível depois da dissecação, para evitar que seque.

49. Os tecidos a seguir indicados devem conservar-se no meio de fixação mais adequado ao tipo de tecido em causa e ao exame histopatológico previsto (40) – os tecidos entre parênteses retos são facultativos:

todas as lesões macroscópicas	coração	pâncreas	estômago (pré-estômago, estômago glandular)
glândulas suprarrenais	íleo	glândulas paratiroides	[dentes]
aorta	jejuno	nervo periférico	testículos
encéfalo (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/ /protuberância anelar)	rins	hipófise	timo
cego	glândulas lacrimais (exo--orbitais)	próstata	tiroide
colo do útero	fígado	reto	[língua]
glândulas de coagulação	pulmões	glândulas salivares	traqueia
cólon	gânglios linfáticos (superficiais e profundos)	vesículas seminais	bexiga urinária
duodeno	glândulas mamárias (obrigatório no caso das fêmeas e, nos machos, se for claramente dissecável)	músculo esquelético	útero, incluindo o colo do útero
epidídimo	[vias respiratórias superiores, incluindo o nariz, os cornetos e os seios paranasais]	pele	[ureteres]
olhos (incluindo a retina)	esófago	medula espinal (a três níveis: cervical, mediotorácico e lombar)	[uretra]
[fémur com articulação]	[bolbo olfativo]	baço	vagina
vesícula biliar (exceto no caso do rato)	ovários	[esterno]	secção da medula óssea e/ou uma punção recente de medula óssea
glândulas de Harder			

▼M4

No caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem ser ambos conservados. Os resultados clínicos ou outros podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem ser conservados também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indiciem que serão provavelmente afetados. Nos estudos por via dérmica, os órgãos a examinar são ainda os constantes da lista relativa à exposição por via oral, mas é necessário proceder igualmente à amostragem e à conservação de pele do local onde o produto químico em estudo foi aplicado. Nos estudos por inalação, a lista de tecidos do aparelho respiratório a conservar e a examinar deve seguir as recomendações dos capítulos B.8 (9) e B.29 (10) deste anexo. A lista de outros órgãos e tecidos a examinar neste caso (além dos tecidos do aparelho respiratório a conservar já especificados) é a estabelecida para a exposição por via oral.

Histopatologia

50. A referência 40 contém orientações sobre as melhores práticas a seguir na realização de estudos de patologias toxicológicas. Os exames histopatológicos devem incidir, no mínimo, no seguinte:

— todos os tecidos dos animais dos grupos de controlo e dos grupos expostos à dose mais elevada,

— todos os tecidos dos animais que morreram ou foram eutanasiados durante o estudo,

— todos os tecidos com anomalias macroscópicas,

— os tecidos dos órgãos afetados, e os tecidos que revelaram alterações atribuíveis à exposição ao produto químico em estudo nos animais dos grupos expostos à dose mais elevada, de todos os animais de todos os outros grupos expostos a uma dose do produto químico,

— no caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem examinar-se ambos.

EXAMES (ETAPA DE CARCINOGENICIDADE)

51. Normalmente no início e no final de cada dia, incluindo fins de semana e feriados, devem verificar-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais. Verifica-se igualmente, uma vez por dia, se os animais têm sinais com importância toxicológica. No caso dos estudos que recorrem à administração por sonda esofágica, os animais devem ser verificados imediatamente após a administração do produto químico. Deve prestar-se especial atenção ao desenvolvimento de tumores, registando-se o tempo decorrido até ao aparecimento destes e o local, as dimensões, o aspeto e a progressão de cada tumor visível na observação macroscópica ou identificável por palpação.

52. Todos os animais devem ser pesados no início da exposição, pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Deve medir-se o consumo de alimentos e a eficiência alimentar pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, deve medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Pode ser útil medir o consumo de água também no caso dos estudos em que se verifiquem alterações do comportamento dos animais a esse nível.

▼M4

Análises hematológicas e de bioquímica clínica e outras determinações

53. A fim de extrair um máximo de informações do estudo, sobretudo no que respeita ao modo de ação, fica ao critério do diretor do estudo proceder à colheita de amostras de sangue para análises hematológicas e de bioquímica clínica. Pode também ser útil efetuar análises de urina. Os dados relativos aos animais utilizados na etapa de toxicidade crónica do estudo — a qual normalmente tem a duração de doze meses (ponto 34) — fornecem informações sobre os parâmetros destas análises. Para mais orientações sobre o interesse da colheita das referidas amostras num estudo de carcinogenicidade, consultar o documento de orientações n.º 116 (7). Se forem colhidas amostras de sangue com essa finalidade, deve efetuar-se a colheita no final do período de ensaio, imediatamente antes da eutanásia dos animais ou integrada nesta. As amostras devem ser colhidas, sob anestesia, num ponto determinado a indicar, por exemplo, por punção cardíaca ou no seio retro-orbital. Podem igualmente preparar-se esfregaços de sangue para exame, em especial se o órgão afetado for a medula óssea. Todavia, tem sido questionada (38) a utilidade deste exame de esfregaços de sangue na etapa de carcinogenicidade para a avaliação do potencial cancerígeno/oncogénico.

PATOLOGIA

Autópsia macroscópica

54. Deve ser realizada a todos os animais estudados — exceto os animais sentinelas e outros animais satélites (ver o ponto 20) — uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Fica ao critério do diretor do estudo decidir em que casos é necessário autopsiar animais sentinelas ou outros animais satélites. A pesagem de órgãos normalmente não faz parte dos estudos de carcinogénese, dado que as alterações geriátricas e o desenvolvimento de tumores em fases avançadas diminuem a utilidade dessas pesagens. Todavia, estas pesagens podem ter muita importância nas avaliações baseadas na suficiência da prova, sobretudo no que respeita ao modo de ação. Se fizerem parte de estudos satélites, deve recolher-se estes dados o mais tardar um ano após o início do estudo.

55. Os tecidos a seguir indicados devem conservar-se no meio de fixação mais adequado ao tipo de tecido em causa e ao exame histopatológico previsto (40) — os tecidos entre parênteses retos são facultativos:

todas as lesões macroscópicas	coração	pâncreas	estômago (pré-estômago, estômago glandular)
glândulas suprarrenais	íleo	glândulas paratiroides	[dentes]
aorta	jejuno	nervo periférico	testículos
encéfalo (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/ /protuberância anelar)	rins	hipófise	timo
cego	glândulas lacrimais (exo--orbitais)	próstata	tiroide
colo do útero	fígado	reto	[língua]
glândulas de coagulação	pulmões	glândulas salivares	traqueia
cólon	gânglios linfáticos (superficiais e profundos)	vesículas seminais	bexiga urinária

▼M4

duodeno	glândulas mamárias (obrigatório no caso das fêmeas e, nos machos, se for claramente dissecável)	músculo esquelético	útero, incluindo o colo do útero
epidídimo	[vias respiratórias superiores, incluindo o nariz, os cornetos e os seios paranasais]	pele	[ureteres]
olhos (incluindo a retina)	esófago	medula espinal (a três níveis: cervical, mediotorácico e lombar)	[uretra]
[fémur com articulação]	[bolbo olfativo]	baço	vagina
vesícula biliar (exceto no caso do rato)	ovários	[esterno]	secção da medula óssea e/ou uma punção recente de medula óssea
glândulas de Harder			

No caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem conservar-se ambos. Os resultados clínicos ou outros podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem conservar-se também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indiciem que serão provavelmente afetados. Nos estudos por via dérmica, os órgãos a examinar são ainda os constantes da lista relativa à exposição por via oral, mas é necessário proceder igualmente à amostragem e à conservação de pele do local onde o produto químico em estudo foi aplicado. Nos estudos por inalação, a lista de tecidos do aparelho respiratório a conservar e a examinar deve seguir as recomendações dos capítulos B.8 (8) e B.29 (9) deste anexo. A lista de outros órgãos e tecidos a examinar neste caso (além dos tecidos do aparelho respiratório a conservar já especificados) é a estabelecida para a exposição por via oral.

Histopatologia

56. A referência 40 contém orientações sobre as melhores práticas a seguir na realização de estudos de patologias toxicológicas. Os exames devem incidir, no mínimo, nos seguintes tecidos:

— todos os tecidos dos animais dos grupos de controlo e dos grupos expostos à dose mais elevada,

— todos os tecidos dos animais que morreram ou foram eutanasiados durante o estudo,

— todos os tecidos com anomalias macroscópicas, incluindo tumores,

— os tecidos que revelaram alterações histopatológicas atribuíveis à exposição ao produto químico em estudo nos animais dos grupos expostos à dose mais elevada, de todos os animais de todos os outros grupos expostos a uma dose do produto químico,

— no caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem examinar-se ambos.

▼M4

DADOS E RELATÓRIOS (TOXICIDADE CRÓNICA E CARCINOGENICIDADE)

Dados

57. Deve apresentar-se os dados por animal relativos a todos os parâmetros avaliados. Esses dados devem ainda ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais no início do ensaio, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados, a hora de cada morte ou eutanásia, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, a descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o momento do seu aparecimento e a sua duração e intensidade, o número de animais que apresentaram lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais que apresentaram cada tipo de lesão. Devem constar dos quadros de resumo dos dados as médias e os desvios-padrão (no caso dos dados contínuos) correspondentes aos animais que apresentaram lesões ou efeitos tóxicos, além do grau das lesões.

58. Os dados históricos de controlo podem ser úteis para a interpretação dos resultados do estudo, por exemplo, quando houver indicações de que os dados provenientes dos grupos de controlo em paralelo divergem significativamente de dados recentes referentes a animais de controlo da mesma colónia e da mesma unidade de ensaio. Caso sejam avaliados dados históricos de controlo, estes devem provir do mesmo laboratório, reportar-se a animais da mesma idade e estirpe e ter sido gerados nos cinco anos anteriores ao estudo em causa.

59. Quando pertinente, deve avaliar-se os resultados numéricos por um método estatístico corrente adequado. Os métodos estatísticos e os dados a analisar devem ser escolhidos no planeamento do estudo (ponto 9). Nessa escolha, deve prever-se os ajustamentos em função do grau de sobrevivência que se revelem necessários.

60. Dados a constar do relatório dos ensaios:

Produto químico em estudo:

— natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas,

— dados de identificação,

— proveniência,

— número de lote,

— boletim de análises químicas.

Veículo (se for o caso):

— justificação da escolha do veículo (se não for água).

Animais estudados:

— espécie e estirpe utilizadas e justificação da opção tomada,

— número, idade e sexo dos animais no início dos ensaios,

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.,

— peso de cada animal no início do ensaio.

▼M4

Condições de realização dos ensaios:

— fundamentação da via de administração e das doses escolhidas,

— métodos estatísticos utilizados na análise dos dados, se for o caso,

— elementos relativos à formulação do produto químico em estudo/à incorporação do mesmo na dieta fornecida aos animais,

— dados analíticos relativos à concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação,

— via de administração e elementos relativos à administração do produto químico em estudo,

— no caso dos estudos por inalação: exposição unicamente nasal ou de corpo inteiro,

— doses reais (mg/kg de peso corporal/dia) e, se for caso disso, fator de conversão entre a concentração do produto químico em estudo na dieta ou na água de beber (mg/kg ou ppm) e a dose real,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água.

Resultados (apresentar quadros de resumo dos dados e os dados por animal):

Informações gerais

— dados de sobrevivência,

— pesos corporais e alterações de peso corporal,

— consumo de alimentos, cálculos da eficiência alimentar (se efetuados) e consumo de água (se for caso disso),

— dados toxicocinéticos, se disponíveis,

— resultados oftalmoscópicos, se disponíveis,

— resultados hematológicos, se disponíveis,

— resultados de química clínica, se disponíveis.

Resultados dos exames clínicos

— sinais de toxicidade,

— incidência (e, se quantificada, intensidade) das anomalias observadas,

— natureza, intensidade e duração dos sinais clínicos observados (reversíveis ou irreversíveis).

Dados das autópsias

— peso corporal terminal,

— peso de cada órgão (e relação com o peso corporal, se for caso disso),

— resultados das autópsias; incidência e intensidade das anomalias.

Histopatologia

— observação de efeitos histopatológicos não neoplásicos,

— observação de efeitos histopatológicos neoplásicos,

▼M4

— correlação entre as observações macroscópicas e os resultados microscópicos,

— descrição pormenorizada dos resultados histopatológicos resultantes da exposição dos animais ao produto químico em estudo, incluindo a classificação de intensidade,

— relatórios do eventual exame das lâminas por pares especialistas.

Tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.

Discussão dos resultados, nomeadamente:

— discussão dos eventuais modelos,

— relações dose-resposta,

— dados históricos de controlo,

— análise dos dados disponíveis sobre modos de ação,

— determinação das doses de referência, do NOAEL e do LOAEL,

— importância para o ser humano.

Conclusões.

REFERÊNCIAS:

(1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Roma, 1995). Documento de trabalho interno. Environment Directorate, OCDE, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. *ATLA* 32:163-208.

(4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 40:145-191.

(5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206:437-445.

(6) Capítulo B.27 deste anexo, "Ensaio de toxicidade oral subcrónica — Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias".

(7) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 — segunda edição. Series on Testing and Assessment No. 116. Disponível no sítio *web* público de *Test Guidelines* da OCDE (www.oecd.org/env/testguidelines).

(8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(9) Capítulo B.8 deste anexo, "Toxicidade subaguda por inalação: Estudo de 28 dias".

(10) Capítulo B.29 deste anexo, "Toxicidade subcrónica por inalação: Estudo de 90 dias".

(11) Capítulo B.9 deste anexo, "Toxicidade (dérmica) da dose repetida (28 dias)".

▼M4

(12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. *Crit. Rev. in Toxicol.* 36:793-801.

(13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., Fenner-Crisp P.A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:581-589.

(14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci.* 89:51-56.

(15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:591-653.

(16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Crit. Rev. Toxicol.* 36:1-7.

(17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Crit. Rev. Toxicol.* 36:9-35.

(18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36:37-68.

(19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36:69-98.

(20) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies. Series on Testing and Assessment No. 35; Series on Pesticides No. 14. ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.

(21) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

(22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection. *Crit. Rev. Toxicol.* 37(9):729-837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran J.A. (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N., Lumley C.E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.

(25) Usui T., Griffiths S.A., Lumley C.E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. *In* D'Arcy POF & Harron DWG (eds.). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast, p. 279-284.

(26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect* 105:1196-1203.

▼**M4**

(27) Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (JO L 276 de 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council (1985). Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, dezembro de 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.

(32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(33) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40:999-1003.

(34) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9:691-704.

(35) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108:267-283.

(36) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1:233-236.

(37) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13:599-609.

(38) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29:198-201.

(39) Documento da EMEA (*draft*) "Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity" (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32:126-131.

▼**M4**

Apêndice 1

DEFINIÇÃO

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼B

B.34. **TESTE DE TOXICIDADE SOBRE A REPRODUÇÃO EM UMA GERAÇÃO**

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 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 a 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 sete dias da semana.

▼B

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 de um 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) deverá (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.

▼B

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 10 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 de uma 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 bioacumulação.

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 órgãos 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.

▼B

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 4.º e 7.º dias 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 órgãos 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) órgão(s)-alvo de todos os animais P. No caso de estes órgãos não terem sido examinados noutros estudos com doses repetidas, deverão ser feitos exames histológicos a todos os animais do grupo tratados com dose mais elevada, do grupo de controlo e aos animais mortos durante o estudo, quando tal for praticável.

Os órgãos 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 órgãos reprodutores dos animais suspeitos de esterilidade poderão ser submetidos a um exame microscópico.

▼B

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.

▼B

B.35. ESTUDO DE TOXICIDADE SOBRE A REPRODUÇÃO EM DUAS GERAÇÕES

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 416 (2001) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio de toxicidade sobre a reprodução em duas gerações destina-se a fornecer informação geral sobre os efeitos de uma substância de ensaio na integridade e no desempenho dos sistemas reprodutores de machos e fêmeas, incluindo a função gonadal, o ciclo do estro, o comportamento de acasalamento, a concepção, a gestação, a parturição, a lactação e o desmame, bem como sobre o crescimento e o desenvolvimento dos descendentes. O estudo pode também dar informações sobre os efeitos da substância de ensaio na morbidade e na mortalidade neonatais e fornecer dados preliminares relativos à toxicidade sobre o desenvolvimento pré-natal e pós-natal, podendo ainda servir de guia para ensaios subsequentes. Além de estudar o crescimento e o desenvolvimento da geração F_1, este método de ensaio destina-se também a avaliar a integridade e o desempenho dos sistemas reprodutores dos machos e fêmeas dessa geração, bem como o crescimento e o desenvolvimento da geração F_2. Caso seja necessário obter informações suplementares relativas à toxicidade sobre o desenvolvimento e às deficiências de desempenho, o presente protocolo pode ser complementado pela introdução de partes de outros estudos descritos em métodos para avaliar a toxicologia sobre o desenvolvimento e/ou a neurotoxicidade sobre o desenvolvimento, conforme o caso; em alternativa, aqueles tópicos podem ser investigados em estudos independentes, com recurso aos métodos de ensaio adequados.

1.2. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância de ensaio é administrada em doses graduais a vários grupos de machos e fêmeas. Os machos da geração P devem ser tratados durante o crescimento e durante pelo menos um ciclo espermatogénico completo (cerca de 56 dias no ratinho e 70 dias no rato), de forma a permitir a detecção de quaisquer efeitos nocivos na espermatogénese. Os efeitos sobre os espermatozóides são determinados por uma série de parâmetros (por exemplo, morfologia e mobilidade) e por exame histopatológico detalhado de preparações de tecidos. Caso tenham sido previamente realizados estudos de dose repetida de duração adequada (por exemplo, um estudo de 90 dias) que forneçam dados sobre a espermatogénese, não será necessário incluir os machos da geração P na avaliação. No entanto, recomenda-se que sejam guardadas amostras ou gravações digitais do esperma da geração P para possibilitar uma avaliação posterior. As fêmeas da geração P devem ser tratadas durante o crescimento e durante vários ciclos estrais completos, para permitir a detecção de quaisquer efeitos adversos causados pela substância de ensaio na normalidade do ciclo do estro. A substância de ensaio é administrada aos animais progenitores (P) durante o acasalamento, durante os períodos de gravidez resultantes e até ao desmame da descendência F_1. Nesta altura, a substância de ensaio passa a ser administrada aos descendentes F_1, que a deverão receber durante o crescimento até à idade adulta, o acasalamento e a produção da geração F_2, até ao desmame da geração F_2.

Todos os animais devem ser objecto de observações clínicas e exames patológicos para se detectarem sinais de toxicidade, devendo dedicar-se atenção especial aos efeitos sobre a integridade e o desempenho dos sistemas reprodutores masculino e feminino, bem como aos efeitos sobre o crescimento e o desenvolvimento da descendência.

▼B

1.3. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.3.1. **Selecção da espécie animal**

A espécie preferida para ensaio é o rato. Caso se utilizem outras espécies, será necessário justificar o seu emprego e introduzir no método de ensaio as modificações apropriadas. Deve evitar-se a utilização de estirpes de fecundidade baixa ou em que se verifique frequentemente uma incidência elevada de deficiências de desenvolvimento. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deverá ser mínima, não podendo ultrapassar 20 % do peso médio de cada sexo.

1.3.2. **Condições de alojamento e alimentação**

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser de 22 ºC (± 3 ºC). A humidade relativa deverá ser de 50 %-60 %, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30 % e um máximo que, preferivelmente, não deverá exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A alimentação pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber. Quando a substância de ensaio for administrada pela alimentação, a escolha da dieta poderá ser condicionada pela necessidade de assegurar a dosagem adequada.

Os animais podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo. O acasalamento deve ocorrer em gaiolas adequadas para o efeito. Quando houver sinais de cópula, as fêmeas acasaladas devem ser colocadas em gaiolas individuais de parto ou de maternidade. Em alternativa, os ratos acasalados podem ser mantidos em grupos pequenos, separando-se apenas um ou dois dias antes do parto. As fêmeas grávidas próximas do termo devem dispor dos materiais de nidificação apropriados e reconhecidos.

1.3.3. **Preparação dos animais**

Devem usar-se animais jovens e saudáveis, que tenham permanecido nas condições experimentais durante pelo menos cinco dias antes do ensaio para aclimatação e que não tenham sido sujeitos a experiências anteriores. Os animais de ensaio devem ser caracterizados no que respeita à espécie, estirpe, proveniência, sexo, peso e/ou idade. Devem conhecer-se as relações de parentesco directo entre os animais, de modo a evitar o acasalamento entre irmãos. Os animais devem ser distribuídos ao acaso pelos grupos de controlo e de tratamento (recomenda-se a estratificação por peso corporal). As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Cada animal deve receber um número de identificação individualizado. Estes procedimentos devem ser levados a efeito antes do início da dosagem dos animais da geração P e por ocasião do desmame dos animais da geração F_1 seleccionados para acasalamento. Devem manter-se registos da ninhada de origem de todos os animais seleccionados da geração F_1. Quando o ensaio envolve pesagem individual das crias ou quaisquer testes de desempenho, as crias devem ser identificadas individualmente o mais cedo possível depois do nascimento.

No início da dosagem, os animais progenitores (P) devem ter cerca de cinco a nove semanas de idade. Os animais de todos os grupos de ensaio deverão ser, tanto quanto possível, uniformes quanto ao peso e à idade.

▼B

1.4. PROCEDIMENTO

1.4.1. **Número e sexo dos animais**

Cada grupo de ensaio e controlo deve comportar um número de animais suficiente para que se obtenham preferivelmente 20 ou mais fêmeas grávidas de termo ou próximas deste. Nos casos em que se utilizem substâncias que causam efeitos indesejáveis relacionados com o tratamento (por exemplo, esterilidade, toxicidade excessiva na dose mais elevada), poderá não ser possível cumprir este requisito. O objectivo é a obtenção de um número de fêmeas grávidas suficiente para garantir uma avaliação significativa do potencial da substância para afectar a fecundidade, a gravidez e o comportamento maternal, bem como o aleitamento, o crescimento e o desenvolvimento da prole F_1, desde a concepção até à maturidade, e o desenvolvimento da sua descendência (F_2) até ao desmame. Por esse motivo, a impossibilidade de obter o número desejado de animais prenhes (isto é, 20) não invalida necessariamente o estudo e deve ser avaliada caso a caso.

1.4.2. **Preparação das doses**

Recomenda-se que a substância de ensaio seja administrada oralmente (através da alimentação, na água de beber ou por *gavage*), excepto nos casos em que se considere mais apropriado utilizar outra via de administração (por exemplo, aplicação cutânea ou inalação).

Se for necessário, a substância de ensaio pode ser dissolvida ou suspensa num agente de transporte apropriado. Recomenda-se que, sempre que possível, seja considerada em primeiro lugar a utilização de uma solução/suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode considerar-se o uso de uma solução/emulsão em óleo (por exemplo, óleo de milho); em última instância, poderá eventualmente recorrer-se ao uso de soluções noutros agentes de transporte. Devem conhecer-se as características tóxicas dos agentes de transporte que não sejam a água. Deve determinar-se a estabilidade da substância de ensaio no agente de transporte.

1.4.3. **Dosagem**

Devem utilizar-se pelo menos três níveis de dose e um controlo simultâneo. A escolha do nível de dose máximo deve ter como objectivo produzir um efeito tóxico, mas não a morte ou sofrimento forte, salvo se existirem limitações impostas pela natureza físico-química ou pelas propriedades biológicas da substância de ensaio. Normalmente, consideram-se aceitáveis estudos com mortalidade inesperada, desde que a taxa de mortalidade dos animais progenitores (P) seja inferior a cerca de 10 %. Deve seleccionar-se uma sequência descendente de níveis de dose que permita detectar qualquer efeito relacionado com a dosagem e determinar o nível sem efeitos adversos observáveis (NSEAO). Em muitos casos, a melhor forma de estabelecer estas sequências consiste no espaçamento das doses em série geométrica, usando factores de dois ou de quatro. A adição de um quarto grupo de ensaio é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes entre as dosagens (ou seja, com um factor superior a 10). Quando a substância de ensaio é administrada na alimentação, o espaçamento entre as doses não deve ser superior a um factor de três. A escolha dos níveis de dose deverá considerar todos os dados de toxicidade existentes, em especial os resultados de estudos de dose repetida, devendo ainda levar em conta quaisquer informações relativas ao metabolismo e à cinética dá substância de ensaio ou de substâncias relacionadas. Estas informações poderão também ser usadas para demonstrar a adequação do regime de dosagem.

▼B

O grupo de controlo deve ser um grupo não sujeito a tratamento ou, se for usado um agente de transporte para administrar a substância de ensaio, um grupo de controlo do agente de transporte. Os animais do grupo de controlo devem ser tratados da mesma maneira que os animais dos grupos de ensaio, com excepção do tratamento com a substância de ensaio. Se for usado um agente de transporte, o grupo de controlo deverá receber o volume máximo de agente de transporte utilizado no ensaio. Se a substância de ensaio for administrada na alimentação e causar uma diminuição da ingestão de alimentos e da sua assimilação, poderá ser necessário utilizar um grupo de controlo negativo (submetido ao mesmo regime alimentar reduzido); em alternativa, poderão usar-se os dados de estudos controlados destinados a avaliar os efeitos da diminuição do consumo de alimento nos parâmetros reprodutores.

Deverão ser tomadas em consideração as seguintes características do agente de transporte e outros aditivos: efeitos na absorção, distribuição, metabolismo ou retenção da substância de ensaio; efeitos nas propriedades químicas da substância de ensaio susceptíveis de alterar as suas características tóxicas; e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais.

1.4.4. **Ensaio-limite**

Se um estudo com um nível de dose oral de pelo menos 1 000 mg/kg de peso corporal/dia (ou uma percentagem equivalente nos alimentos ou na água de beber, caso se recorra a um destes tipos de administração), realizado de acordo com os procedimentos descritos neste estudo, não provocar efeitos tóxicos observáveis nos animais progenitores nem na sua prole e se, para além disso, os dados existentes sobre compostos estrutural e/ou metabolicamente relacionados com a substância de ensaio não sugerirem a possível ocorrência de toxicidade, poderá considerar-se desnecessário realizar um ensaio completo com vários níveis de dose. O ensaio-limite é sempre válido, excepto nos casos em que se preveja exposição humana e em que seja necessário testar um nível de dose oral mais elevado. Quando se usam outras formas de administração, como inalação ou aplicação cutânea, as propriedades físico-químicas da substância de ensaio (por exemplo, a solubilidade) são muitas vezes indicativas e limitantes do nível máximo de exposição praticável.

1.4.5. **Administração das doses**

Os animais devem ser tratados com a substância de ensaio durante os sete dias da semana. A forma de administração preferida é a via oral (alimentação, água de beber ou *gavage*). Se for usada outra via de administração, deverão ser indicadas as razões subjacentes à sua escolha; neste caso, poderá ser necessário introduzir modificações apropriadas no método de ensaio. Deve utilizar-se o mesmo método de administração em todos os animais durante o período experimental apropriado. A administração por *gavage* deve ser feita com uma sonda gástrica. O volume de líquido administrado numa toma não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal (o volume máximo para óleo de milho é de 0,4 ml/100 g de peso corporal); exceptuam-se as soluções aquosas, que podem ser administradas na proporção de 2 ml/100 g de peso corporal. Deve minimizar-se a variabilidade do volume de ensaio efectuando ajustes nas concentrações, de forma a assegurar a constância do volume em todos os níveis de dose; exceptuam-se os casos em que se utilizam substâncias irritantes ou corrosivas, que normalmente exercem efeitos exacerbados quando aplicadas em concentrações mais elevadas. Normalmente, nos estudos com administração por *gavage*, as crias amamentadas só recebem a substância de ensaio de forma indirecta, através do leite; a dosagem directa inicia-se apenas na altura do desmame. Nos estudos em que a substância de ensaio é administrada na alimentação ou na água de beber, as crias podem receber uma quantidade adicional da substância de ensaio quando, na última semana do período de lactação, começam a comer por si próprias.

▼B

É importante assegurar que as quantidades de substância de ensaio administradas através da alimentação ou da água de beber não interferem nas exigências normais de nutrição ou de consumo de água. Quando a substância de ensaio for incorporada na alimentação, pode utilizar-se uma concentração alimentar constante (ppm) ou, alternativamente, um nível de dose constante em relação ao peso corporal dos animais; deve especificar-se o método escolhido para o ensaio. No caso de uma substância administrada por *gavage*, a dose deve ser administrada todos os dias à mesma hora, devendo ser ajustada pelo menos uma vez por semana a fim de se manter uma dose constante em relação ao peso corporal do animal; estes ajustes deverão ser feitos tendo em conta os dados relativos à distribuição placentária.

1.4.6. **Plano da experiência**

A substância de ensaio começa a ser administrada diariamente aos machos e fêmeas progenitores (P) ao atingirem entre cinco e nove semanas de idade. A dosagem diária dos machos e fêmeas F_1 deve começar na altura do desmame; importa ter presente que, quando a substância de ensaio é administrada através da alimentação ou na água de beber, pode ocorrer exposição directa das crias da geração F_1 à substância de ensaio durante o período de lactação. O tratamento de ambos os sexos das gerações P e F_1 deve decorrer durante pelo menos 10 semanas antes do acasalamento, prosseguindo nas duas semanas do período de acasalamento. Os machos devem ser sacrificados e examinados quando deixam de ser necessários para avaliação de efeitos sobre o aparelho reprodutor. A dosagem das fêmeas progenitoras (P) deve continuar durante a gravidez, prolongando-se até ao desmame da prole F_1. O esquema de administração poderá ser modificado com base em informações relativas à substância de ensaio, incluindo dados sobre toxicidade, indução de metabolismo ou bioacumulação. Normalmente, a dose a administrar a cada animal é calculada com base na determinação mais recente do seu peso corporal. No entanto, o ajuste das doses durante o último terço da gravidez deve ser feito com precaução.

O tratamento dos machos e fêmeas P e F_1 deve continuar até ao momento do sacrifício. Todos os machos e fêmeas adultos P e F_1 devem ser sacrificados quando deixarem de ser necessários para avaliação de efeitos sobre a reprodução. Os animais da descendência F_1 não seleccionados para acasalamento e todos os descendentes F_2 deverão ser sacrificados após o desmame.

1.4.7. **Processo de acasalamento**

1.4.7.1. *Acasalamento dos progenitores (P)*

Para o acasalamento, cada fêmea deve ser colocada juntamente com um único macho pertencente ao mesmo nível de dosagem (acasalamento 1:1) até que ocorra cópula ou tenham decorrido duas semanas. As fêmeas devem ser examinadas diariamente para verificar a presença de esperma ou um rolhão vaginal. Considera-se o dia 0 de gravidez aquele em que se observa um rolhão vaginal e/ou esperma. Quando a tentativa de acasalamento for mal sucedida, poderá tentar-se um novo acasalamento das fêmeas com machos do mesmo grupo comprovadamente aptos a procriar. Os pares acasalados devem ser identificados nos dados do ensaio de forma inequívoca. Deve evitar-se o acasalamento entre irmãos.

▼B

1.4.7.2. *Acasalamento de F_1*

Para o acasalamento da descendência F_1 e produção da geração F_2, devem seleccionar-se pelo menos um macho e uma fêmea de cada ninhada, em altura de desmame, para acasalamento com outras crias pertencentes ao mesmo nível de dose mas provenientes de ninhadas diferentes. A selecção das crias de cada ninhada deve ser feita de forma aleatória, desde que não se verifiquem diferenças significativas no peso corporal ou na aparência dos animais. Caso se observem essas diferenças, devem seleccionar-se os animais mais representativos de cada ninhada. Embora a forma mais correcta de selecção seja aquela que se baseia no peso corporal, em determinadas circunstâncias poderá ser mais conveniente recorrer à aparência. A descendência F_1 só deve acasalar depois de ter atingido a maturidade sexual completa.

Os casais sem descendência devem ser avaliados para determinar as causas da aparente esterilidade. Esta avaliação pode envolver novas tentativas de acasalamento com outros machos ou fêmeas comprovadamente aptos a procriar, o exame microscópico dos órgãos reprodutores e a observação dos ciclos do estro ou da espermatogénese.

1.4.7.3. *Segundo acasalamento*

Em determinadas circunstâncias, tais como situações em que se verifiquem alterações na dimensão da ninhada relacionadas com o tratamento ou em que se observe um efeito ambíguo no primeiro acasalamento, recomenda-se que os adultos P ou F_1 acasalem de novo para produzir uma segunda ninhada. O segundo acasalamento de fêmeas ou machos que não tenham produzido ninhadas deverá ser feito com reprodutores comprovados do sexo oposto. Se numa das gerações for estritamente necessário produzir uma segunda ninhada, os animais devem acasalar novamente cerca de uma semana depois do desmame da última ninhada.

1.4.7.4. *Dimensão das ninhadas*

Os animais devem poder parir normalmente e criar os seus descendentes até ao desmame. A uniformização do tamanho das ninhadas é opcional; caso seja feita, deve descrever-se pormenorizadamente o método usado.

1.5. OBSERVAÇÕES

1.5.1. **Observações clínicas**

Deve efectuar-se diariamente uma observação clínica geral; nos casos em que a dose é administrada por *gavage*, a escolha do momento da observação deve tomar em consideração o período de efeitos máximos previsto que se verifica após a administração da dose. Devem registar-se quaisquer modificações de comportamento, sinais de parto difícil ou prolongado e todos os sinais de toxicidade. Deverá efectuar-se uma inspecção adicional mais pormenorizada de cada animal pelo menos uma vez por semana, que por conveniência poderá coincidir com o momento da pesagem. Para além disso, cada animal deve ser observado duas vezes por dia (ou uma vez por dia durante o fim-de-semana, quando for conveniente) para avaliar morbidade e mortalidade.

▼B

1.5.2. **Peso corporal e consumo de alimento/água dos animais progenitores**

Os animais progenitores (P e F_1) devem ser pesados no primeiro dia de tratamento e, em seguida, pelo menos uma vez por semana. O peso das fêmeas progenitoras (P e F_1) deve ser determinado, no mínimo, nos dias 0, 7, 14 e 20 ou 21 da gestação, durante a lactação (nos dias coincidentes com a pesagem das crias) e no dia do sacrifício. Estas observações devem ser registadas individualmente para cada animal adulto. Durante os períodos de pré-acasalamento e gestação, o consumo de alimento deve ser medido pelo menos semanalmente. Se a substância de ensaio for administrada na água, o consumo de água deve ser determinado pelo menos uma vez por semana.

1.5.3. **Ciclo do estro**

A duração e a normalidade do ciclo do estro nas fêmeas P e F_1 são avaliadas por observação de esfregaços vaginais obtidos antes do acasalamento, durante o acasalamento (opcional) e até existirem evidências de cópula. A remoção de células vaginais/cervicais deve ser feita cuidadosamente, de modo a evitar o distúrbio da mucosa e a subsequente indução de uma gravidez fictícia (1).

1.5.4. **Parâmetros dos espermatozóides**

No momento do sacrifício, deverá registar-se o peso dos testículos e do epidídimo de todos os machos P e F_1 após o sacrifício. Deve reservar-se um exemplar de cada tipo de órgão para exame histopatológico (ver secções 1.5.7 e 1.5.8.1). Para a contagem de espermatídios e de espermatozóides das reservas do conduto epididimário resistentes a homogeneização, deverão usar-se, respectivamente, os testículos e os epidídimos de subgrupos de pelo menos 10 machos de cada grupo P e F_1. Deve colher-se o esperma do conduto epididimário ou do canal deferente dos animais desses subgrupos para avaliar a mobilidade e a morfologia dos espermatozóides. Se forem detectados efeitos relacionados com o tratamento ou se estudos anteriores indicarem possíveis efeitos na espermatogénese, deverão analisar-se os espermatozóides de todos os machos de cada grupo de dose; caso contrário, a contagem pode restringir-se aos machos P e F_1 dos grupos de controlo e de dose máxima.

Deve proceder-se à contagem do número total de espermatídios testiculares e de espermatozóides do conduto epididimário resistentes a homogeneização (2) (3). O número de espermatozóides das reservas do conduto pode ser determinado considerando o volume e a concentração de esperma na suspensão usada para a análise qualitativa e efectuando a contagem de espermatozóides após maceração e/ou homogeneização do restante tecido do conduto. As contagens devem ser feitas nos subgrupos de machos seleccionados de todos os grupos de dosagem e ser levadas a efeito imediatamente após o sacrifício dos animais, excepto se forem feitas gravações de vídeo ou digitais ou se os animais forem congelados para análise posterior. Nestes casos, podem analisar-se primeiro os grupos de controlo e de dose máxima; se não se observarem efeitos relacionados com o tratamento (por exemplo, efeitos na contagem, mobilidade ou morfologia dos espermatozóides), não será necessário avaliar os restantes grupos de dose; caso contrário, deverão analisar-se também os grupos de dosagem inferior.

▼B

A mobilidade dos espermatozóides do epidídimo (ou do canal deferente) deve ser analisada ou gravada em vídeo imediatamente após o sacrifício. O esperma deve ser retirado o mais rapidamente possível, enquanto os danos são mínimos; seguidamente, deve ser diluído para uma análise de mobilidade usando métodos aprovados (4). A determinação da percentagem de espermatozóides progressivamente móveis poderá ser tanto subjectiva como objectiva. Quando se realiza uma análise de mobilidade assistida por computador (5) (6) (7) (8) (9) (10), a determinação da mobilidade progressiva baseia-se em valores críticos definidos pelo utilizador em relação à velocidade média e à rectitude da trajectória, ou índice linear. Se existirem gravações em vídeo de amostras (11) ou outras imagens obtidas durante a necropsia, pode efectuar-se posteriormente a análise dos machos P e F_1 dos grupos de controlo e de dose máxima. Se não se observarem efeitos relacionados com o tratamento, será desnecessário avaliar os restantes grupos de dose; caso contrário, deverão analisar-se também os grupos de dosagem inferior. Caso não existam imagens de vídeo ou digitais, todas as amostras de todos os grupos de tratamento devem ser analisadas no momento da necropsia.

Deve efectuar-se a análise morfológica de uma amostra de espermatozóides epididimários (ou do canal deferente). Depois de fixados, os espermatozóides (pelo menos 200 por amostra) são examinados em preparações húmidas (12) e classificados como normais ou anormais. As anomalias morfológicas em espermatozóides incluem fusão, cabeças isoladas e ausência de cabeças e/ou de caudas. A avaliação deve ser feita nos subgrupos de machos seleccionados de todos os grupos de dose, quer imediatamente após o sacrifício dos animais, quer posteriormente, usando gravações de vídeo ou digitais. Depois de fixados, os esfregaços podem também ser guardados para análise posterior. Nestas situações, podem analisar-se primeiro os grupos de controlo e de dose máxima. Se não se observarem efeitos relacionados com o tratamento (por exemplo, efeitos na morfologia dos espermatozóides), não será necessário analisar os restantes grupos de dose; caso contrário, deverão analisar-se também os grupos de dosagem inferior.

Caso um dos parâmetros de avaliação de espermatozóides acima mencionados tenha sido examinado anteriormente num estudo sistémico de toxicidade de pelo menos 90 dias, poderá considerar-se desnecessário repetir a sua avaliação no estudo em duas gerações. Recomenda-se, no entanto, que se guardem amostras ou gravações digitais de espermatozóides da geração P para possibilitar uma avaliação posterior, caso esta venha a ser necessária.

1.5.5. **Descendência**

Cada ninhada deve ser examinada o mais cedo possível após o parto (dia 0 de lactação) para se determinar o número e o sexo das crias, os nados-mortos, os nados-vivos e a presença de anomalias macroscópicas. Caso não se encontrem maceradas, as crias encontradas mortas no dia 0 devem ser examinadas para determinar eventuais malformações e a causa da morte; estes animais devem manter-se conservados. As crias vivas devem ser contadas e pesadas individualmente no momento do nascimento (dia 0 de lactação) ou no dia 1; a partir daí, os pesos devem ser avaliados em dias regulares de pesagem, por exemplo, nos dias 4, 7, 14 e 21 de lactação. Devem registar-se as alterações físicas ou de comportamento observadas nas mães ou nos descendentes.

▼B

A avaliação do desenvolvimento físico da descendência deve basear-se principalmente no aumento do peso corporal. Outros parâmetros físicos (por exemplo, abertura dos olhos e ouvidos, erupção dos dentes, crescimento de pêlo) poderão dar informações suplementares. No entanto, estes dados deverão ser considerados preferencialmente no contexto da maturação sexual (por exemplo, idade e peso corporal no momento da abertura vaginal ou da separação bálano-prepucial) (13). Devem efectuar-se avaliações de desempenho (por exemplo, actividade motora, função sensorial e ontogenia dos reflexos) da descendência F_1 antes e/ou depois do desmame, dedicando especial atenção aos aspectos relacionados com a maturação sexual, caso não tenham sido incluídas em estudos independentes. Deve determinar-se a idade da abertura vaginal e da separação do prepúcio nos animais recém-desmamados seleccionados para acasalamento. Se forem detectadas alterações na proporção entre os sexos ou no tempo de maturação sexual dos animais F_1, deverá medir-se a distância anogenital das crias F_2 no dia 0 pós-natal.

As observações de desempenho poderão ser omitidas em grupos que revelem claramente outros sinais de efeitos adversos (por exemplo, um decréscimo significativo na progressão do peso, etc.). Caso se realizem, as avaliações de desempenho não devem ser efectuadas em crias seleccionadas para acasalamento.

1.5.6. **Necropsia macroscópica**

Todos os animais progenitores (P e F_1), bem como todas as crias apresentando anomalias externas ou sinais clínicos e uma cria seleccionada aleatoriamente das gerações F_1 e F_2, escolhida ao acaso quanto ao sexo e à ninhada de origem, devem ser analisados macroscopicamente no momento do sacrifício ou da morte no decurso do estudo para se detectar qualquer anomalia estrutural ou alteração patológica; deverá dedicar-se uma atenção especial aos órgãos do aparelho reprodutor. Caso não se encontrem maceradas, as crias sacrificadas, em estado moribundo ou encontradas mortas devem ser examinadas para se determinarem eventuais malformações e/ou a causa da morte; estes animais devem manter-se conservados.

Devem examinar-se os úteros de todas as fêmeas primíparas a fim de se detectarem a presença e o número de locais de implantação; este exame deverá ser feito de forma a não comprometer a avaliação histopatológica.

1.5.7. **Pesagem dos órgãos**

No momento do sacrifício, deverá determinar-se o peso do corpo e dos seguintes órgãos de todos os animais progenitores P e F_1 (os órgãos pares devem ser pesados individualmente):

— útero, ovários,

— testículos, epidídimo (total e conduto),

— próstata,

— vesículas seminais, glândulas coagulantes e respectivos fluidos e próstata (como uma unidade),

— cérebro, fígado, rins, baço, glândula pituitária, tiróide, glândulas supra-renais e órgãos-alvo conhecidos.

Devem determinar-se os pesos corporais terminais das crias F_1 e F_2 seleccionadas para necropsia, devendo ainda pesar-se o cérebro, o baço e o timo de uma cria seleccionada aleatoriamente quanto ao sexo e à ninhada de origem (ver secção 1.5.6).

▼B

Sempre que possível, a avaliação dos resultados da necropsia macroscópica e da pesagem de órgãos deverá ser efectuada tendo em conta os dados de outros estudos de dose repetida.

1.5.8. **Histopatologia**

1.5.8.1. *Animais progenitores*

Devem ser fixados e conservados em meio adequado para exame histopatológico os seguintes órgãos e tecidos de animais progenitores (P e F_1) (ou amostras representativas):

— vagina, útero com colo e ovários (preservados em fixador adequado);

— um testículo (preservado em fixador de Bouin ou equivalente), um epidídimo, vesículas seminais, próstata e glândula coagulante;

— órgão(s)-alvo previamente identificado(s) de todos os animais P e F_1 seleccionados para acasalamento.

Serão objecto de um exame histopatológico completo os órgãos e tecidos conservados acima mencionados de todos os animais P e F_1 dos grupos de controlo e de dose máxima seleccionados para acasalamento. A inspecção dos ovários dos animais P é opcional. Serão examinados os órgãos que apresentem alterações relacionadas com o tratamento dos animais dos grupos de doses média e baixa, a fim de auxiliar a determinação do NSEAO. Adicionalmente, deverá efectuar-se a avaliação histopatológica dos órgãos reprodutores de animais dos grupos de dose média e baixa suspeitos de fertilidade reduzida (por exemplo, animais com insucesso no acasalamento, concepção, geração ou parto de uma descendência saudável, ou animais com alterações nos ciclos do estro ou no número, mobilidade ou morfologia dos espermatozóides). Deverão examinar-se todas as lesões macroscópicas, tais como atrofias ou tumores.

Os testículos devem ser objecto de um exame histopatológico pormenorizado (por exemplo, usando fixador de Bouin, inclusão em parafina e secções transversais com 4-5μm de espessura) a fim de se detectarem efeitos relacionados com o tratamento, tais como retenção de espermatídios, ausência de camadas ou tipos de células germinais, células gigantes multinucleadas ou perda de células espermatogénicas para o lúmen (14). O exame do epidídimo intacto deve abranger a cabeça, o corpo e o conduto e pode efectuar-se por observação de uma secção longitudinal. A análise do epidídimo destina-se a detectar infiltração de leucócitos, alteração na prevalência de tipos de células, tipos de células aberrantes e fagocitose de espermatozóides. Os órgãos reprodutores masculinos podem ser examinados recorrendo ao uso de PAS (ácido p-aminossalicílico) e coloração com hematoxilina.

Os ovários no período pós-lactação devem conter folículos primordiais e folículos em crescimento, bem como os grandes corpos amarelos da lactação. O exame histopatológico deverá detectar uma diminuição qualitativa da população de folículos primordiais. As fêmeas F_1 devem ser submetidas a uma avaliação quantitativa dos folículos primordiais; o número de animais, a selecção da secção do ovário e o tamanho da amostra seccionada devem ser adequados, do ponto de vista estatístico, para o procedimento de avaliação usado. O exame deve incluir a contagem do número de folículos primordiais (que poderão estar combinados com pequenos folículos em crescimento) em ovários de tratamento e em ovários de controlo, para posterior comparação de resultados (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2. *Animais recém-desmamados*

Devem ser fixados e conservados em meio apropriado para exame histopatológico os tecidos e órgãos-alvo com anomalias macroscópicas de todas as crias que apresentem anomalias externas ou sinais clínicos, bem como de uma cria seleccionada aleatoriamente das gerações F_1 e F_2, escolhida ao acaso quanto ao sexo e à ninhada de origem e que não tenha sido seleccionada para acasalamento. Deve efectuar-se a caracterização histopatológica completa do tecido conservado, dando especial atenção aos órgãos do aparelho reprodutor.

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os dados devem ser registados individualmente e resumidos na forma de quadros, indicando, em relação a cada grupo de ensaio e cada geração, o número de animais no início do ensaio, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou sacrificados, o momento de todas as mortes ou sacrifícios, o número de animais férteis, o número de fêmeas grávidas, o número de animais com manifestações de toxicidade, uma descrição dos sinais de toxicidade observados (incluindo o momento do aparecimento, a duração e a intensidade), os tipos de observações feitas nos progenitores e nos descendentes, os tipos de alterações histopatológicas e todos os dados relevantes relativos às ninhadas.

Os resultados numéricos devem ser avaliados com um método estatístico adequado e geralmente aceite; a escolha do método estatístico deve constar do planeamento do estudo e ser devidamente justificada. Os modelos estatísticos dose-resposta podem ser úteis para a análise dos dados. O relatório deve incluir informação suficiente sobre o método de análise e o programa informático usados para que um examinador/estatístico independente possa reavaliar e reconstituir a análise.

2.2. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados recolhidos no estudo de toxicidade sobre a reprodução em duas gerações, incluindo os relativos aos exames microscópicos e necropsias, deverão ser analisados em termos dos efeitos observados. A análise deverá considerar a relação (ou a ausência de relação) entre a dose da substância de ensaio e a presença ou ausência, incidência e gravidade de anomalias, incluindo lesões macroscópicas, órgãos identificados como alvos, alterações da fertilidade, anomalias clínicas, alterações da reprodução e procriação, alterações do peso corporal, efeitos na mortalidade e quaisquer outros efeitos tóxicos. A análise dos resultados do ensaio deve ainda ter em conta as propriedades físico-químicas da substância de ensaio, assim como informação toxicocinética, se disponível.

Um ensaio de toxicidade sobre a reprodução bem elaborado deverá fornecer uma estimativa satisfatória do nível sem efeito e dar conhecimento dos efeitos adversos na reprodução, parturição, lactação e desenvolvimento pós-natal, incluindo o crescimento e o desenvolvimento sexual.

▼B

2.3. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A finalidade de um estudo de toxicidade sobre a reprodução em duas gerações consiste na obtenção de informações relativas aos efeitos de exposição repetida a uma substância durante todas as fases do ciclo reprodutor. Mais especificamente, o estudo fornece informações sobre os parâmetros reprodutores, bem como sobre o desenvolvimento, o crescimento, a maturação e a sobrevivência da descendência. A interpretação dos resultados deve tomar em consideração dados de estudos subcrónicos, de desenvolvimento pré-natal e toxicocinéticos, entre outros eventualmente disponíveis. Os resultados deste estudo podem ser usados para avaliar a necessidade de realizar ensaios suplementares sobre uma substância química. A extrapolação dos resultados para a espécie humana tem uma validade limitada; mais adequado será usar os dados do ensaio para obter informação sobre níveis sem efeito e níveis toleráveis de exposição humana (20) (21) (22) (23).

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Substância de ensaio:

— natureza física e, se relevante, propriedades físico-químicas;

— dados de identificação;

— pureza.

Agente de transporte (se apropriado):

— caso o agente de transporte não seja água, uma justificação para a sua escolha.

Animais de ensaio:

— espécie/estirpe usada;

— número, idade e sexo dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, dieta, materiais de nidificação, etc.;

— pesos individuais dos animais no início do ensaio.

Condições de ensaio:

— razões que presidiram à escolha dos diferentes níveis de doses;

— informação pormenorizada sobre a formulação da substância de ensaio/preparação da dieta, concentrações atingidas;

— estabilidade e homogeneidade da preparação;

— informação pormenorizada sobre a administração da substância de ensaio;

— conversão da concentração da substância de ensaio na dieta/água de beber (ppm) para a dose real (mg/kg de peso corporal/dia), se aplicável;

— informação pormenorizada sobre a qualidade dos alimentos e da água.

▼B

Resultados:

— consumo de alimentos, consumo de água (se disponível), eficiência do regime alimentar (aumento do peso corporal por grama de alimento consumido) e consumo da substância de ensaio pelos animais P e Fl, excepto durante o período de coabitação e durante pelo menos o último terço do período de lactação;

— dados de absorção (se disponíveis);

— dados dos pesos corporais dos animais P e F_1 seleccionados para acasalamento;

— pesos das ninhadas e das crias;

— peso corporal no momento do sacrifício e pesos absolutos e relativos dos órgãos dos animais progenitores;

— natureza, gravidade e duração de efeitos detectados em observações clínicas (reversíveis ou não);

— momento da morte no decurso do estudo ou indicação dos animais sobreviventes no termo da experiência;

— dados de resposta tóxica por sexo e por dose, incluindo índices de acasalamento, fertilidade, gestação, nascimento, viabilidade e lactação; os números usados para calcular estes índices devem constar do relatório;

— efeitos tóxicos (ou outros) na reprodução, descendência, crescimento pós-natal, etc.;

— resultados da necropsia;

— descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas;

— número de fêmeas P e F_1 com ciclos normais e duração dos ciclos;

— número total de espermatozóides no conduto epididimário; percentagem de espermatozóides progressivamente móveis; percentagem de espermatozóides morfologicamente normais e percentagem de espermatozóides que apresentam cada uma das anomalias identificadas;

— duração do acasalamento, incluindo o número de dias até à sua concretização;

— duração do período de gestação;

— número de implantações, corpos amarelos, dimensão da ninhada;

— número de nados-vivos e de perdas pós-implantação;

— número de crias com anomalias macroscópicas visíveis; deve indicar-se o número de animais de tamanho inferior ao normal, caso tenha sido determinado;

— dados sobre aspectos físicos característicos das crias e outros dados de desenvolvimento pós-natal; deve ser dada uma justificação relativamente à escolha dos aspectos físicos analisados;

— dados sobre observações de desempenho nas crias e adultos, se aplicável;

— tratamento estatístico dos resultados, se apropriado.

▼B

Análise dos resultados.

Conclusões, incluindo os valores dos NSEAO para efeitos sobre as mães e os descendentes.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Sadleir, R.M.F.S., (1979) Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al., (1989) A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, p. 92-108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978) Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54 p. 103-107.

(4) Klinefelter, G.R. et al., (1991) The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology*, 5, p. 39-44

(5) Seed, J. et al., (1996) Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology*, 10(3), p. 237-244.

(6) Chapin, R.E. et al., (1992) Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology*, 6, p. 267-273

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992) Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology*, 13, p. 409-421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991) Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology*, 5, p. 449--458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993) Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology,* Part A., Academic, Orlando, Florida, p. 319-333.

(10) Toth, G.P. et al., (1989) The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology, 10, p. 401-415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987) Computerised Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology, 8, p. 330-337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992) Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology, 6, p. 491-505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977) Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction, 17, p. 298303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990) Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993) Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, p. 421-426.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989) Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,., (1991) Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology, 5, p. 379-383.

(19) Heindel, J.J., (1999) Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston and C.A. Kimmel (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A., (1991) Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989) Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K., (1981) In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K., (1978) In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36. **TOXICOCINÉTICA**

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 417 da OCDE (2010). Os estudos toxicocinéticos realizados aos produtos químicos visam obter informações adequadas sobre a absorção, distribuição, biotransformação (metabolismo) e excreção dos mesmos, facilitar o estabelecimento de uma relação entre a concentração ou dose e a toxicidade observada e contribuir para a compreensão do mecanismo através do qual os produtos químicos em causa exercem a sua toxicidade. A toxicocinética pode ajudar a elucidar os estudos toxicológicos, ao demonstrar que a exposição dos animais ao produto químico em estudo é de natureza sistémica e ao revelar quais são as entidades circulantes (produto químico parental ou metabolitos deste). Os parâmetros toxicocinéticos básicos extraídos destes estudos também fornecem informações sobre o potencial de acumulação do produto químico em questão nos tecidos e/ou órgãos e sobre o potencial de indução de biotransformações devidas à exposição ao produto químico em causa.

2. Os dados toxicocinéticos podem ser úteis para apreciar a adequação e pertinência da extrapolação de dados de toxicidade em animais com vista à avaliação de perigos e/ou riscos para o ser humano. Os estudos toxicocinéticos também podem proporcionar informações úteis para a determinação das doses a utilizar em estudos de toxicidade (cinética linear ou não linear), bem como da relação entre a via de administração e os efeitos produzidos, da biodisponibilidade e de outros aspetos, relativos à conceção do estudo. Determinados tipos de dados toxicocinéticos podem servir para construir modelos toxicocinéticos de base fisiológica.

3. Os dados toxicocinéticos e metabólicos são importantes a diversos títulos. Podem, por exemplo, dar indicações acerca de possíveis efeitos tóxicos e modos de ação, bem como sobre a relação destes com as doses e com a via de exposição. Por outro lado, os dados metabólicos podem proporcionar informações úteis para avaliar a importância, no plano toxicológico, da exposição a metabolitos exógenos do produto químico em estudo.

4. Dispor de dados toxicocinéticos adequados ajudará a confirmar a aceitabilidade e aplicabilidade de métodos baseados em relações estrutura-atividade, interpolações e agrupamentos para avaliar a segurança de produtos químicos. Os dados cinéticos também podem servir para avaliar a pertinência toxicológica de outros estudos (por exemplo, *in vivo* e *in vitro*).

5. Salvo indicação em contrário (ver, nomeadamente, os pontos 74 a 78), este método pressupõe a administração por via oral do produto químico em estudo.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

6. As diversas regulamentações estabelecem exigências e necessidades diferentes quanto aos efeitos e parâmetros toxicocinéticos a medir relativamente a cada classe de produtos químicos (pesticidas, biocidas, produtos químicos industriais, etc.). Contrariamente à maioria dos outros métodos, este método descreve ensaios toxicocinéticos que compreendem múltiplas medições e múltiplos efeitos observados. Futuramente, poderão vir a ser elaborados novos métodos de ensaio e/ou documentos de orientação que individualizem e pormenorizem mais cada efeito observado. No que respeita ao presente método, cada regulamentação estabelece as exigências e/ou necessidades ao nível dos ensaios e avaliações a realizar.

▼M4

7. São numerosos os estudos que podem ser realizados para avaliar o comportamento toxicocinético de produtos químicos para efeitos da regulamentação aplicável. Todavia, consoante as necessidades ou situações concretas ao nível da regulamentação, nem todos esses estudos poderão ser necessários para avaliar o produto químico em causa. Na conceção de estudos toxicocinéticos é necessário ser flexível e ter em conta as características do produto químico em causa. Em alguns casos, pode ser suficiente explorar um determinado conjunto de questões para atender aos perigos e riscos associados ao produto químico em causa. Por vezes, podem obter-se dados toxicocinéticos no âmbito da avaliação efetuada no quadro de outros estudos toxicológicos. Noutros casos, podem ser necessários estudos toxicocinéticos suplementares e/ou mais aprofundados, se a regulamentação o exigir e/ou ou se a avaliação do produto químico em causa suscitar novas interrogações.

8. A fim de melhorar a qualidade do estudo e de evitar o recurso desnecessário a animais, antes de realizar o estudo o laboratório deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa e os metabolitos e análogos deste. Entre essas informações podem contar-se dados obtidos por outros métodos de ensaio pertinentes (estudos *in vivo* ou *in vitro* e/ou avaliações *in silico* — ou seja, por simulação computacional). No planeamento do estudo e na interpretação dos resultados pode ser útil ter presente as propriedades físico-químicas (tais como o coeficiente de partição octanol/água, expresso em log P_{OW}, o pKa, a hidrossolubilidade, a pressão de vapor e o peso molecular) do produto químico em causa. Estas propriedades podem determinar-se pelos métodos adequados descritos nos métodos de ensaio correspondentes.

LIMITAÇÕES

9. Este método não se adapta a casos especiais, tais como fêmeas grávidas ou em lactação e progenituras, nem à avaliação de eventuais resíduos em animais destinados à alimentação humana expostos. Todavia, os dados provenientes de estudos pelo método B.36 podem fornecer informações suscetíveis de orientar a conceção de estudos específicos para esses casos. O presente método não se destina ao ensaio de nanomateriais. Um relatório do exame preliminar da aplicabilidade das *Test Guidelines* da OCDE aos nanomateriais (1) indica que a *Test Guideline 417* (equivalente ao presente método) pode não se aplicar a estes materiais.

DEFINIÇÕES

10. Definem-se no apêndice alguns conceitos utilizados neste método.

CONSIDERAÇÕES DE BEM-ESTAR ANIMAL

11. O documento de orientações n.º 19 da OCDE (2) contém orientações sobre o tratamento ético dos animais. Recomenda-se a consulta deste documento da OCDE relativamente a todos os estudos *in vivo* e *in vitro* referidos no presente método de ensaio.

DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

Estudos-piloto

12. Recomenda-se e incentiva-se a realização de estudos-piloto para escolher os parâmetros experimentais para os estudos de toxicocinética (por exemplo, metabolismo, balanço de massas, protocolos analíticos, dosagens, exalação de CO_2, etc.). A caracterização de alguns destes parâmetros pode dispensar o recurso a produtos químicos com marcação radioativa.

▼M4

Escolha dos animais

Espécie

13. De preferência, a espécie e a estirpe dos animais utilizados nos ensaios de toxicocinética devem ser idênticas às utilizadas nos outros estudos toxicológicos realizados com o produto químico em causa. Normalmente utiliza-se o rato, espécie amplamente usada nos estudos toxicológicos. Pode justificar-se o recurso a outras espécies ou a utilização de espécies adicionais se estudos toxicológicos importantes evidenciarem efeitos tóxicos significativos nessas espécies ou se a toxicidade/toxicocinética nessas espécies for comprovadamente mais pertinente para o ser humano. É necessário justificar a escolha da espécie e da estirpe de animal.

14. Salvo menção em contrário, este método pressupõe que a espécie ensaiada é o rato. Se forem utilizadas outras espécies, pode ser necessário alterar determinados aspetos do método.

Idade e estirpe

15. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis, normalmente com 6 a 12 semanas na altura da exposição (ver também os pontos 13 e 14). É necessário justificar o recurso a animais que não sejam adultos jovens. No início do estudo, os animais devem ter todos idades aproximadas. As diferenças de peso de animal para animal não devem desviar-se mais de 20 % do peso médio de todos os animais do grupo. Idealmente, a estirpe utilizada deve ser idêntica à utilizada para constituir a base de dados toxicológicos do produto químico em causa.

Número e sexo dos animais

16. Para cada dose ensaiada, o número mínimo de animais é de quatro de um dos sexos, sendo necessário justificar o sexo dos animais utilizados. Deve ponderar-se a utilização de animais de ambos os sexos (quatro machos e quatro fêmeas) caso haja indícios de diferenças significativas de toxicidade entre os sexos.

Condições de alojamento e de alimentação

17. Normalmente, os animais são alojados individualmente durante o ensaio. Em circunstâncias especiais, pode justificar-se um alojamento agrupado. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C; a humidade relativa de 30 % a 70 %. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

Produto químico em estudo

18. Em todos os aspetos do estudo relacionados com o balanço de massas e com a identificação dos metabolitos, o produto químico utilizado deve estar marcado com o isótopo radioativo ^{14}C. Todavia, se puder demonstrar-se que:

— é possível efetuar o balanço de massas e identificar os metabolitos utilizando o produto químico sem marcação radioativa,

— a especificidade e a sensibilidade analíticas do método sem o produto químico com marcação radioativa são iguais ou superiores às que se obteriam com marcação radioativa,

▼M4

não será necessário utilizar um produto químico com marcação radioativa. Por outro lado, podem utilizar-se outros isótopos radioativos ou estáveis, especialmente se o elemento em questão for a causa da toxicidade ou integrar a parte tóxica do produto químico em estudo. Se possível, o marcador radioativo deve localizar-se numa parte central da molécula que seja estável ao metabolismo (não permutável, não metabolizada em CO_2 nem passa a fazer parte dos radicais monocarbonados do organismo). Para discernir o destino metabólico do produto químico em estudo, pode ser necessário marcar vários pontos ou determinadas regiões da sua molécula.

19. É necessário determinar o grau de pureza e identificar os produtos químicos com e sem marcação radioativa recorrendo a métodos de análise adequados. A pureza radiológica de um produto químico radioativo deve ser a máxima atingível no caso desse produto químico (idealmente superior a 95 %) e deve fazer-se um esforço razoável para identificar as impurezas cuja concentração seja igual ou superior a 2 %. O grau de pureza, bem como a identidade e a proporção das impurezas identificadas, devem constar do relatório. Determinados programas obrigatórios podem optar por fornecer orientações suplementares para a definição e caracterização dos produtos químicos constituídos por misturas, bem como de métodos para determinação da pureza.

Escolha das doses

Estudo-piloto

20. Normalmente, é suficiente no estudo-piloto uma dose única por via oral. A dose não deve ser tóxica, mas deve ser suficientemente elevada para possibilitar a identificação dos metabolitos nas excreções (e no plasma, se for caso disso), assim como para a consecução dos objetivos do estudo-piloto, expressos no ponto 12.

Estudos principais

21. Nos estudos principais, é preferível ensaiar pelo menos duas doses, dado que as informações obtidas a partir desse número mínimo de grupos de dose podem facilitar a escolha das doses a ensaiar noutros estudos de toxicidade, bem como a avaliação da relação dose-resposta em ensaios de toxicidade já realizados.

22. Se forem administradas duas doses, ambas devem ser suficientemente elevadas para possibilitar a identificação dos metabolitos nas excreções (e no plasma, se for caso disso). Na escolha das doses devem ponderar-se as informações extraíveis dos dados de toxicidade disponíveis. Caso não se disponha de informações (provenientes, por exemplo, de estudos de toxicidade aguda por via oral nos quais se registem sinais clínicos de toxicidade ou de estudos de toxicidade por dose repetida), pode ponderar-se, para dose mais elevada, um valor inferior à estimativa da DL_{50} (vias oral e dérmica) ou à estimativa da CL_{50} (via inalatória) ou um valor inferior ao valor mais baixo do intervalo de toxicidade aguda estimado. A dose mais baixa deve ser uma fração da dose mais elevada.

23. Caso o estudo incida apenas numa dose, idealmente esta deve ser suficientemente elevada para possibilitar a identificação dos metabolitos nas excreções (e no plasma, se for caso disso), sem gerar efeitos tóxicos visíveis. Se não for ensaiada uma segunda dose, é necessário justificá-lo.

24. Se for necessário determinar o efeito da dose nos processos cinéticos, duas doses podem não ser suficientes e pelo menos uma das doses utilizadas deve ser suficientemente elevada para saturar esses processos. Uma evolução não linear da área abaixo da curva da concentração no plasma em função do tempo (AUC) entre duas doses utilizadas no estudo principal constitui indício forte da saturação de um ou mais processos cinéticos algures entre essas duas doses.

▼M4

25. No caso dos produtos químicos de baixa toxicidade, deve utilizar-se uma dose máxima de 1 000 mg/kg de peso corporal pelas vias oral ou dérmica; se a administração for por via inalatória, ver orientações no capítulo B.2 deste anexo, mas normalmente a dose máxima não excederá 2 mg/l. Por razões específicas ligadas ao produto químico em estudo, pode ser necessária uma dose mais elevada, consoante o exija a regulamentação aplicável. É sempre necessário justificar as doses escolhidas.

26. Os dados toxicocinéticos e de distribuição pelos tecidos obtidos a partir de uma dose única podem ser suficientes para determinar o potencial de acumulação e/ou de persistência. Todavia, em determinadas circunstâncias, pode ser necessário administrar repetidamente a dose, para melhor avaliar o potencial de acumulação e/ou de persistência ou a evolução dos parâmetros toxicocinéticos (por exemplo, a indução e a inibição enzimáticas) ou para responder às exigências da regulamentação aplicável. Nos estudos com repetição de doses, é normalmente suficiente utilizar doses baixas, mas, em determinadas circunstâncias, também pode ser necessário utilizar doses elevadas (ver também o ponto 57).

Administração do produto químico em estudo

27. Deve dissolver-se o produto químico em estudo, ou preparar-se uma suspensão homogénea do mesmo, no mesmo veículo utilizado nos outros estudos de toxicidade oral com administração por sonda esofágica efetuados com o produto químico em causa, se esse veículo for conhecido. É necessário justificar o veículo escolhido. A escolha do veículo e do volume de dosagem são aspetos a considerar na conceção do estudo. O método habitual de administração é por sonda esofágica. Todavia, em determinadas situações, pode ser vantajoso proceder à administração por meio de uma cápsula de gelatina ou por incorporação na dieta, sendo necessário justificar ambas as opções. É igualmente necessário dispor de meios de verificação da dose efetivamente administrada a cada animal.

28. O volume máximo de líquido a administrar de cada vez por meio de sonda esofágica depende do tamanho do animal, do tipo de veículo de dosagem e da suspensão ou não da alimentação antes da administração do produto químico em estudo. É necessário explicar por que razão se mantém ou se restringe a alimentação antes da administração das doses. Normalmente, o volume utilizado deve ser o menor possível, tanto no caso dos veículos aquosos como dos veículos não aquosos. No caso dos roedores, o volume das doses não deve, normalmente, exceder 10 mg/kg de peso corporal. No caso dos produtos químicos mais lipofílicos, o volume do veículo pode ser de 4 ml/kg de peso corporal ou superior. Nos casos de administração repetida das doses, em que o jejum diário seria contraindicado, pode ponderar-se utilizar volumes de dose inferiores (por exemplo, 2 a 4 ml/kg de peso corporal). Se possível, deve procurar utilizar-se volumes de dose coerentes com os administrados noutros estudos orais por sonda esofágica do produto químico em causa.

29. A administração intravenosa do produto químico em estudo e a medição do teor deste no sangue e/ou nas excreções pode servir para determinar a biodisponibilidade ou a absorção oral relativa. Nos estudos por via intravenosa, administra-se uma dose única (normalmente equivalente à dose mais baixa por via oral, sem a exceder — ver a escolha das doses) do produto químico num veículo adequado. Administra-se a dose num volume adequado (por exemplo, 1 ml/kg de peso corporal), no local de administração escolhido, a, pelo menos, quatro animais do sexo adequado (caso se justifique, podem utilizar-se animais de ambos os sexos — ver o ponto 16). É necessário dissolver completamente ou preparar uma suspensão integral da dose do produto químico em estudo a administrar por via intravenosa. O veículo utilizado nesta via de administração não deve interferir no fluxo sanguíneo nem afetar as células sanguíneas. Se o produto químico em estudo for injetado por meio de bombagem, é necessário indicar no relatório a velocidade de perfusão e esta deve ser normalizada para todos os animais. Caso se proceda à encanulação da veia jugular (para administração do produto químico em estudo e/ou para colheita de sangue) ou se utilize a

▼M4

artéria femoral para a administração do produto químico, é necessário anestesiar o animal. Há que ponderar bem o tipo de anestesia, dado que esta pode influenciar a toxicocinética. Os animais devem poder restabelecer-se convenientemente antes de lhes ser administrado o produto químico em estudo incorporado no veículo.

30. No caso de determinados produtos químicos, pode recorrer-se a outras vias de administração, como as vias dérmica ou inalatória (ver os pontos 74 a 78), em função das propriedades físico-químicas do produto químico em causa e da utilização ou exposição humanas previsíveis.

Medições

Balanço de massas

31. Estabelece-se o balanço de massas somando as quantidades correspondentes às percentagens da dose (radioativa) administrada excretadas na urina, nas fezes e no ar expirado e as quantidades correspondentes às percentagens presentes nos tecidos, na carcaça restante e nas águas de lavagem da gaiola (ver o ponto 46). Em geral, consideram-se adequadas recuperações totais do produto químico (radioatividade) administrado superiores a 90 %.

Absorção

32. Pode efetuar-se uma primeira estimativa da absorção excluindo do balanço de massas as quantidades correspondentes à percentagem da dose presente no trato gastrointestinal e/ou nas fezes. Para o cálculo da percentagem de absorção, ver o ponto 33. Para a análise das excreções, ver os pontos 44 a 49. Se não for possível determinar com exatidão, por meio de um balanço de massas, a absorção subsequente a uma administração por via oral (por exemplo, se mais de 20 % da dose administrada estiver presente nas fezes), podem ser necessários estudos mais aprofundados. Estes estudos podem compreender a administração oral do produto químico e a determinação deste na bílis ou a administração oral e intravenosa do produto químico e a determinação da diferença entre as quantidades deste presentes na urina, no ar expirado e na carcaça, depois de administrado por cada uma destas vias. Em ambos os casos, mede-se a radioatividade em vez de efetuar uma análise química específica do produto químico em estudo e dos seus metabolitos.

33. Para estudar a excreção biliar, normalmente procede-se à administração por via oral. Neste estudo, insere-se uma cânula no ducto biliar de, pelo menos, quatro animais do sexo adequado (ou, caso se justifique, de ambos os sexos), procedendo-se à administração de uma única dose do produto químico em estudo. Depois desta administração, deve monitorizar-se a excreção de radioatividade/do produto químico em estudo na bílis durante o tempo necessário para estimar a percentagem da dose administrada que é excretada por esta via, a qual se pode utilizar para calcular, em seguida, a percentagem de absorção por via oral:

$$\text{Percentagem de absorção} = \frac{\begin{array}{l}(\text{quantidade presente na bílis} + \text{ na urina} + \text{ no ar expirado} + \\ \text{na carcaça, com exclusão da quantidade presente no trato} \\ \text{gastrointestinal})/\text{quantidade administrada} \times 100\end{array}}{}$$

34. No caso de determinadas classes de produtos químicos, a dose absorvida pode ser diretamente segregada através das membranas intestinais. Nesses casos, a determinação da percentagem da dose administrada presente nas fezes após administração de uma dose por via oral a ratos com uma cânula inserida no ducto biliar não se considera representativa da dose não absorvida. Recomenda-se que, nos casos em que se preveja secreção intestinal, se calcule a percentagem da dose que é absorvida a partir de um cálculo da absorção por comparação da excreção após administração por via oral e por via intravenosa (ratos intactos ou com uma cânula inserida no ducto biliar) — ver o ponto 35. Recomenda-se igualmente que, se for considerado necessário quantificar a secreção intestinal, se meça a excreção após administração por via intravenosa em ratos com uma cânula inserida no ducto biliar.

▼M4

Biodisponibilidade

35. Pode determinar-se a biodisponibilidade a partir da cinética no plasma/no sangue dos grupos expostos por via oral e por via intravenosa, conforme se descreve nos pontos 50 a 52, efetuando análises químicas específicas do produto químico em estudo e/ou do(s) metabolito(s) correspondente(s) e dispensando-se, portanto, a marcação radioativa do produto químico em causa. Pode então calcular-se a biodisponibilidade (F) do produto químico em estudo ou do(s) metabolito(s) correspondente(s) do seguinte modo:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dose_{IV}/Dose_{exp})$$

em que AUC é a área abaixo da curva de concentração no plasma em função do tempo e "exp" é a via experimental (oral, dérmica ou inalatória).

36. A fim de avaliar o risco de efeitos sistémicos, é geralmente preferível recorrer à biodisponibilidade do componente tóxico, em vez da percentagem de absorção, para comparar as concentrações sistémicas em estudos efetuados em animais com dados análogos de biomonitorização provenientes de estudos de exposição profissional. A situação pode tornar-se mais complexa se as doses se situarem numa zona de resposta não linear, pelo que é importante que um estudo toxicocinético prévio permita escolher uma gama de doses com resposta linear.

Distribuição pelos tecidos

37. O conhecimento da distribuição pelos tecidos do produto químico em estudo e/ou dos metabolitos do mesmo é importante para a identificação dos tecidos-alvo e para a compreensão dos mecanismos subjacentes à toxicidade, bem como para obter informações sobre o potencial de acumulação e persistência do produto químico e dos metabolitos. Pelo menos no termo do estudo de excreção (normalmente até sete dias após a administração da dose, em função do comportamento do produto químico em estudo), deve medir-se a percentagem da dose (radioativa) total presente nos tecidos e na carcaça restante. Caso não se detete o produto químico nos tecidos no final do estudo (por exemplo, por aquele ter sido eliminado anteriormente, devido a uma meia vida curta), importa não interpretar mal os dados. Nessas situações, é necessário examinar a distribuição pelos tecidos quando se atinge a concentração máxima do produto químico (e/ou dos metabolitos) no plasma/no sangue (T_{max}) ou a taxa máxima de excreção urinária (ver o ponto 38). Além disso, pode ser necessário colher tecidos noutros momentos para determinar a distribuição do produto químico em estudo (e/ou dos metabolitos) pelos tecidos, para avaliar a eventual dependência do tempo, para facilitar o balanço de massas e/ou se a autoridade competente o exigir. Entre os tecidos a colher contam-se o fígado, gordura, o trato gastrointestinal, os rins, o baço, o sangue total, a carcaça restante, os órgãos-alvo e quaisquer outros (por exemplo, a tiroide, eritrócitos, os órgãos reprodutores, a pele e — sobretudo em animais pigmentados — os olhos) potencialmente importantes para a avaliação toxicológica do produto químico em estudo. Deve-se procurar examinar o máximo de tecidos nos mesmos momentos, para otimizar a utilização dos animais e no caso de, em estudos de toxicidade crónica ou subcrónica, se observarem efeitos tóxicos em órgãos-alvo. Deve indicar-se igualmente no relatório as concentrações do resíduo (radioativo) e a relação entre essas concentrações nos tecidos e no plasma (no sangue).

38. A avaliação da distribuição pelos tecidos noutros momentos, tais como o momento em que são atingidos o pico de concentração no plasma/no sangue (por exemplo, T_{max}) ou a taxa máxima de excreção urinária, obtida, respetivamente, nos ensaios cinéticos do plasma/do sangue e nos ensaios de excreção urinária, também pode ser uma exigência das autoridades competentes. As informações neste domínio podem facilitar a compreensão da toxicidade e do potencial de acumulação e persistência do produto químico em estudo e dos metabolitos. É necessário justificar a escolha das amostras. As amostras a analisar são geralmente as já indicadas (ver o ponto 37).

▼M4

39. Nos estudos da distribuição pelos tecidos, pode quantificar-se a radioatividade procedendo à dissecação, homogeneização, combustão e/ou solubilização dos órgãos e depois à contagem da cintilação em fase líquida dos resíduos retidos. Determinadas técnicas, atualmente em diversos estádios de desenvolvimento — por exemplo, a autorradiografia quantitativa de corpo inteiro e a autorradiografia microscópica dos recetores —, podem ser úteis para determinar a distribuição do produto químico em estudo pelos órgãos e/ou tecidos (3)(4).

40. Se a via de exposição não for a via oral, deve colher-se e analisar-se determinados tecidos específicos, tais como os pulmões, nos estudos por inalação, e a pele, nos estudos por via dérmica. Ver os pontos 74 a 78.

Metabolismo

41. É necessário recolher as excreções (e, se for caso disso, colher amostras de plasma) para proceder à identificação e quantificação do produto químico inalterado e dos metabolitos do mesmo, como se descreve nos pontos 44 a 49. Para facilitar a identificação dos metabolitos, aceita-se a reunião das excreções de um determinado grupo de dose. Recomenda-se que se estabeleça o perfil dos metabolitos correspondente a cada período do estudo. Todavia, se a falta de amostras e/ou de radioatividade o inviabilizar, aceita-se a reunião da urina e das fezes correspondentes a diversos momentos do estudo, mas não das correspondentes aos dois sexos ou a doses diferentes. Na análise da urina, das fezes, da radioatividade presente no ar expirado pelos animais expostos e da bílis devem ser utilizados métodos qualitativos e quantitativos adequados.

42. Deve fazer-se um esforço razoável para identificar os metabolitos presentes em concentrações iguais ou superiores a 5 % da dose administrada e para traçar um esquema metabólico do produto químico em estudo. Se a quantidade do produto químico em estudo nas excreções representar 5 % ou mais da dose administrada, é necessário que o produto químico seja aí identificado. Entende-se por "identificação" a determinação da estrutura exata dos componentes. Normalmente, procede-se à identificação efetuando simultaneamente um traçado cromatográfico (cocromatografia) do metabolito e de padrões conhecidos, por dois sistemas diferentes, ou recorrendo a técnicas que permitam determinar a estrutura, tais como a espetrometria de massa, a ressonância magnética nuclear e outras. No caso da cocromatografia, não se considera que o recurso a técnicas cromatográficas que utilizem a mesma fase estacionária com dois sistemas de solventes diferentes constitua uma verificação por dois métodos adequada da identidade dos metabolitos, dado que os métodos não seriam independentes. A identificação por cocromatografia deve processar-se mediante o recurso a dois sistemas diferentes e independentes no plano analítico, tais como a cromatografia em camada fina normal ou com inversão de fases e a HPLC (cromatografia em fase líquida de alta eficiência). Se a qualidade da separação cromatográfica for adequada, não é necessária uma confirmação por meios espetroscópicos. Para uma identificação inequívoca, também pode recorrer-se a métodos que forneçam informações estruturais, tais como cromatografia em fase líquida/espetrometria de massa, cromatografia em fase líquida/espetrometria de massa, seguida de nova espetrometria de massa (em tandem), cromatografia em fase gasosa/espetrometria de massa e espetrometria de ressonância magnética nuclear.

43. Se não for possível identificar os metabolitos que representem, individualmente, 5 % ou mais da dose administrada, deve constar do relatório final uma justificação ou explicação disso. Pode ser útil identificar metabolitos que representem menos de 5 % da dose administrada, para melhorar a compreensão da via metabólica com vista à avaliação dos perigos e/ou riscos associados ao produto químico em estudo. Sempre que possível, deve apresentar-se uma confirmação da estrutura. Para isso, pode ser necessário estabelecer o perfil metabólico no plasma, no sangue ou noutros tecidos.

▼M4

Excreção

44. Para conhecer a taxa e o grau de excreção da dose administrada, determina-se a percentagem da dose (radioativa) recuperada na urina, nas fezes e no ar expirado, dados que também são necessários para o balanço de massas. Devem determinar-se as quantidades do produto químico em estudo (radioatividade) eliminadas na urina, nas fezes e no ar expirado a intervalos de tempo adequados (ver os pontos 47 a 49). Os ensaios por dose repetida devem ser concebidos de maneira a possibilitarem a recolha de dados de excreção para cumprir convenientemente os objetivos descritos no ponto 26, o que permitirá efetuar comparações com os ensaios de dose única.

45. Se um estudo-piloto tiver revelado que não são excretadas no ar expirado quantidades significativas (de acordo com o ponto 49) do produto químico (radioatividade), não é necessário recolher o ar expirado no estudo definitivo.

46. Para a recolha das excreções (urina, fezes e ar expirado), coloca-se cada animal numa unidade individual de estudo do metabolismo. No final de cada período de recolha (ver os pontos 47 a 49), lavam-se essas unidades com um solvente adequado ("lavagem da gaiola"), para máxima recuperação do produto químico em estudo (da radioatividade). A recolha das excreções deve terminar ao sétimo dia ou quando tiverem sido recolhidos 90 % da dose administrada, consoante o que ocorrer primeiro.

47. Deve determinar-se a quantidade total do produto químico em estudo (radioatividade) na urina em dois momentos, pelo menos, do primeiro dia de recolha — um dos quais 24 horas após a administração da dose — e posteriormente uma vez por dia, até ao termo do estudo. Incentiva-se que, no primeiro dia, haja mais de dois momentos de recolha (por exemplo, às 6, 12 e 24 horas). Devem analisar-se os resultados dos estudos-piloto a fim de tirar ilações sobre momentos de recolha diferentes ou suplementares. É necessário fundamentar os programas de recolha.

48. Deve determinar-se diariamente a quantidade total do produto químico em estudo (radioatividade) nas fezes, com início 24 horas após a administração da dose e até ao termo do estudo, a menos que os estudos-piloto aconselhem momentos de recolha diferentes ou suplementares. É necessário fundamentar programas de recolha diferentes.

49. Caso se detete menos de 1 % da dose administrada no ar expirado num período de 24 horas, pode cessar-se a recolha do CO_2 expirado e de outros produtos voláteis no estudo em curso.

Estudos em função do tempo

Cinética no plasma/no sangue

50. Estes estudos visam obter estimativas dos principais parâmetros toxicocinéticos – por exemplo, C_{max}, T_{max}, meia vida ($t_{1/2}$) e AUC – do produto químico em estudo. Podem efetuar-se com a administração de uma dose única, mas geralmente administram-se duas ou mais doses. A escolha das doses depende da natureza do ensaio e/ou do aspeto em estudo. Os dados cinéticos podem ser necessários para resolver questões como a da biodisponibilidade do produto químico e/ou para elucidar o efeito da dose na eliminação (por exemplo, para verificar se a saturação da eliminação depende ou não da dose).

51. O número mínimo de animais a utilizar nestes estudos é de quatro animais de um dos sexos por grupo de dose. É necessário justificar o sexo dos animais utilizados. Deve ponderar-se a utilização de animais de ambos os sexos (quatro machos e quatro fêmeas) caso haja indícios de diferenças significativas de toxicidade entre os sexos.

▼M4

52. Após a administração do produto químico em estudo (com marcação radioativa), devem colher-se amostras de sangue de cada animal em momentos adequados e segundo um método apropriado. O volume e o número de amostras de sangue que podem colher-se em cada animal podem estar limitados pelos efeitos potenciais de colheitas sucessivas na saúde/fisiologia do animal e/ou pela sensibilidade do método analítico. Devem analisar-se amostras correspondentes a cada animal. Em determinadas circunstâncias (por exemplo, a caracterização de metabolitos), pode ser necessário reunir amostras colhidas em diversos animais. Essa reunião de amostras deve ser justificada e as amostras dela resultantes devem ser claramente identificadas. Caso se utilize um produto químico com marcação radioativa, pode justificar-se determinar a radioatividade total presente. Se assim for, deve determinar-se a radioatividade total no sangue total e no plasma, ou no plasma e nos eritrócitos, para cálculo da razão sangue/plasma. Noutras situações, podem ser necessários estudos mais específicos que passem pela identificação de compostos parentais e/ou de metabolitos ou pela avaliação da fixação a proteínas.

Outros estudos cinéticos em tecidos

53. Estes estudos visam obter informações sobre a evolução no tempo, para elucidar questões relacionadas com aspetos como o modo da ação tóxica, a bioacumulação e a biopersistência, mediante a determinação dos níveis do produto químico em estudo em diversos tecidos. A escolha dos tecidos e o número de momentos a avaliar dependerão do aspeto a elucidar e da base de dados toxicológicos disponível para o produto químico. Na conceção destes estudos cinéticos complementares em tecidos, devem ser tidos em conta as informações reunidas conforme se descreveu nos pontos 37 a 40. Estes estudos podem efetuar-se com uma única dose ou repetindo a dose. É necessário justificar pormenorizadamente as opções tomadas.

54. Entre as razões que podem justificar a realização de outros estudos cinéticos em tecidos contam-se as seguintes:

— meia vida prolongada no sangue, indiciadora da possível acumulação do produto químico em estudo em diversos tecidos,

— interesse em verificar se foi atingido um estado estacionário em determinados tecidos (por exemplo, em estudos por dose repetida, embora a concentração do produto químico em estudo no sangue possa aparentemente ter atingido um estado estacionário, pode ser útil confirmar se também se atingiu uma concentração estacionária nos tecidos-alvo).

55. Neste tipo de estudos em função do tempo, deve administrar-se por via oral uma dose adequada do produto químico em causa a, pelo menos, quatro animais por dose e por ponto temporal, medindo-se a distribuição ao longo do tempo nos tecidos escolhidos. Podem utilizar-se animais todos do mesmo sexo, a menos que os efeitos tóxicos observados evidenciem alguma especificidade sexual. Também consoante o aspeto a elucidar, assim se analisarão ou não a radioatividade total ou o produto químico parental e/ou os metabolitos. Avalia-se a distribuição pelos tecidos recorrendo a técnicas adequadas.

Indução/inibição enzimáticas

56. Num ou mais dos seguintes casos pode ser necessário estudar eventuais efeitos de indução/inibição enzimáticas ou a biotransformação do produto químico em estudo:

1) Se houver indícios de uma relação entre a biotransformação do produto químico e o aumento da toxicidade do mesmo;

2) Se os dados de toxicidade disponíveis revelarem uma relação não linear entre a dose e o metabolismo;

▼M4

3) Se os estudos de identificação dos metabolitos tiverem identificado um metabolito potencialmente tóxico que possa ter sido produzido por uma via enzimática induzida pelo produto químico em estudo;

4) Para explicar efeitos supostamente ligados a fenómenos de indução enzimática;

5) No caso de experiências *in vitro* ou *in vivo* com espécies e condições diferentes, se forem observadas alterações toxicológicas significativas do perfil metabólico do produto químico em estudo, situação em que pode ser necessário caracterizar a(s) enzima(s) em causa (por exemplo, enzimas da fase I, tais como as isoenzimas do sistema das mono-oxigenases dependentes do citocromo P450, enzimas da fase II, tais como isoenzimas da sulfotransferase ou da uridina-difosfato-glucoronosiltransferase, ou qualquer outra enzima pertinente). Estas informações podem ser utilizadas para avaliar a pertinência da espécie em causa para extrapolações interespécies.

57. Para avaliar variações toxicocinéticas ligadas ao produto químico em estudo, devem ser utilizados protocolos de estudo adequados, devidamente validados e fundamentados. Constituem exemplos desses estudos a administração repetida de doses do produto químico não marcado, seguida de uma dose única com marcação radioativa ao décimo quarto dia, ou a administração repetida de doses do produto químico com marcação radioativa, seguida da colheita de amostras ao primeiro, sétimo e décimo quarto dias para determinação dos perfis metabólicos. A administração repetida de doses do produto químico em estudo com marcação radioativa também pode fornecer informações sobre a bioacumulação (ver o ponto 26).

OUTRAS ABORDAGENS

58. Além das experiências *in vivo* descritas no presente método, há outras possibilidades de obter informações úteis sobre a absorção, a distribuição, o metabolismo ou a eliminação de produtos químicos em determinadas espécies.

Utilização de dados obtidos *in vitro*

59. Utilizando sistemas de ensaio adequados, podem estudar-se *in vitro* diversos aspetos relativos ao metabolismo de um produto químico. Podem utilizar-se hepatócitos recentemente isolados ou de cultura ou frações subcelulares (por exemplo, microssomas e citosol ou a fração S9) hepáticas para estudar possíveis metabolitos. O metabolismo local no órgão-alvo — por exemplo, os pulmões — pode ter interesse para a avaliação dos riscos. As frações microssómicas de tecidos-alvo podem ser úteis para esse efeito. Os estudos com microssomas podem ter utilidade para investigar eventuais diferenças entre os sexos ou relacionadas com o estádio vital e para caracterizar parâmetros enzimáticos (K_m e V_{max}) que podem facilitar a avaliação de dependências entre o metabolismo e as doses de exposição. Por outro lado, os microssomas podem ser úteis na identificação das enzimas microssomáticas que participam no metabolismo do produto químico em estudo, aspeto que pode ser importante para as extrapolações interespécies (ver também o ponto 56). Pode igualmente examinar-se o potencial de indução de biotransformação utilizando frações subcelulares hepáticas (por exemplo, os microssomas e o citosol) de animais pré-expostos ao produto químico em causa, através de estudos de indução de hepatócitos *in vitro* ou a partir de linhagens celulares específicas que exprimam as enzimas pertinentes. Em determinadas circunstâncias e em condições adequadas, pode ponderar-se a utilização de frações subcelulares provenientes de tecidos humanos para determinar eventuais diferenças entre espécies ao nível da biotransformação. Os resultados de estudos *in vitro* também podem ter utilidade no desenvolvimento de modelos toxicocinéticos de base fisiológica (5).

▼M4

60. A partir de estudos *in vitro* de absorção por via dérmica podem obter-se informações suplementares para caracterização da absorção (6).

61. Pode utilizar-se culturas primárias de células hepáticas e cortes recentes de tecidos para estudar aspetos semelhantes aos estudados com os microssomas hepáticos. Em certos casos, poderão elucidar-se determinadas questões utilizando linhagens celulares que exprimam especificamente a enzima em causa, ou linhagens celulares geneticamente modificadas. Noutros casos, pode ser útil estudar *in vitro* a inibição e indução de isozimas específicas do citocromo P450 (por exemplo, CYP1A1, 2E1, 1A2, etc.), e/ou de enzimas da fase II, pelo composto parental. As informações obtidas podem ser úteis para compostos com estrutura semelhante.

Utilização como informação complementar de dados toxicocinéticos provenientes de estudos de toxicidade

62. A análise de amostras de sangue, tecidos e/ou excreções obtidas noutros estudos de toxicidade pode fornecer dados sobre a biodisponibilidade, a evolução da concentração no plasma ao longo do tempo (AUC, C_{max}), o potencial de bioacumulação, as velocidades de eliminação e diferenças metabólicas ou cinéticas ligadas ao sexo ou ao estádio vital.

63. Pode efetuar-se adaptações ao nível da conceção do estudo para elucidar questões relacionadas com a saturação das vias de absorção, de biotransformação e de excreção a doses elevadas, com o funcionamento de novas vias metabólicas a essas doses ou com o confinamento dos metabolitos tóxicos a tais doses.

64. Outros aspetos ligados à avaliação dos perigos que podem ser examinados:

— sensibilidade dependente da idade, devido a diferenças no estado da barreira hemato-encefálica, ao nível renal e/ou nas capacidades de desintoxicação,

— sensibilidade de determinadas subpopulações devido a diferentes capacidades de biotransformação ou a outras diferenças toxicocinéticas,

— grau de exposição fetal por transferência transplacentária do produto químico ou grau de exposição neonatal através da lactação.

Utilização de modelos toxicocinéticos

65. Os modelos toxicocinéticos podem ser úteis para diversos aspetos da avaliação dos perigos e dos riscos, por exemplo, na previsão da exposição sistémica e da dose transmitida aos tecidos internos. Estes modelos também podem ter utilidade para elucidar determinadas questões relativas ao modo de ação, podendo servir de base para extrapolações interespécies, vias de exposição e perfis de dosagem, bem como para avaliar o risco para o ser humano. Entre os dados úteis para o desenvolvimento de modelos toxicocinéticos de base fisiológica para um produto químico numa determinada espécie contam-se 1) os coeficientes de partição, 2) as constantes bioquímicas e os parâmetros fisiológicos, 3) os parâmetros de absorção específicos da via de exposição e 4) dados cinéticos *in vivo* para aferição dos modelos – por exemplo, parâmetros de eliminação para as vias de excreção pertinentes (> 10 %) ou K_m e V_{max} para o metabolismo. Os dados experimentais utilizados no desenvolvimento de modelos devem ser obtidos por métodos cientificamente consistentes e os resultados da aplicação dos modelos devem ser validados. Para facilitar o desenvolvimento de modelos não compartimentais ou de base fisiológica, determinam-se frequentemente parâmetros específicos do produto químico em estudo ou da espécie em causa, tais como taxas de absorção, o coeficiente de repartição entre o sangue e os tecidos e as constantes metabólicas.

▼M4

DADOS E RELATÓRIOS

66. Recomenda-se que o relatório do estudo tenha um índice.

Corpo do relatório

67. O corpo do relatório deve estar organizado nas seguintes secções e subsecções e conter as informações previstas no presente método:

Resumo

68. Deve resumir a conceção do estudo e descrever os métodos utilizados. Deve igualmente salientar os principais resultados, nomeadamente os relativos ao balanço de massas, à natureza e importância dos metabolitos, aos resíduos nos tecidos, à taxa de eliminação, ao potencial de bioacumulação e às diferenças entre os sexos. Deve ser suficientemente pormenorizado para possibilitar a avaliação dos resultados.

Introdução

69. Deve compreender os objetivos, os fundamentos e a conceção do estudo, bem como as referências pertinentes e os eventuais elementos históricos.

Objetos e métodos do estudo

70. Deve descrever pormenorizadamente todas as informações pertinentes, nomeadamente:

a) Produto químico em estudo

Relativamente à identificação do produto químico, deve compreender a denominação química, a estrutura molecular, a composição química qualitativa e quantitativa, o grau de pureza química e, se possível, o tipo e a quantidade de cada impureza. Deve compreender igualmente informações sobre as propriedades físico-químicas, nomeadamente o estado físico, a cor, a solubilidade bruta e/ou o coeficiente de partição, a estabilidade e, se for caso disso, a corrosividade. Se aplicável, devem ser fornecidos elementos relativos aos isómeros. Se o produto químico em estudo tiver marcação radioativa, deve indicar-se o tipo de radionuclídeo, a posição do marcador, a atividade específica e o grau de pureza radioquímica.

É igualmente necessário indicar o tipo de cada veículo, diluente, agente de suspensão, emulsionante ou qualquer outra matéria utilizada para administrar o produto químico em estudo, ou descrevê-los.

b) Animais estudados

Deve compreender informações sobre os animais estudados, nomeadamente: escolha da espécie e da estirpe e justificação da escolha, idade no início do estudo, sexo, peso corporal, estado de saúde e manutenção dos animais.

c) Métodos

Deve explicar a conceção do estudo e o método utilizado e incidir nos seguintes elementos:

1) Justificação das alterações da via ou das condições de exposição eventualmente efetuadas;

▼M4

2) Justificação das doses escolhidas;

3) Descrição dos estudos-piloto eventualmente utilizados na conceção experimental dos estudos subsequentes, incluindo os dados de base provenientes dos primeiros;

4) Modo de preparação da solução administrada e tipo de solvente ou veículo, se tiver sido utilizado algum;

5) Número de grupos expostos e número de animais por grupo;

6) Nível e volume das doses (e a atividade correspondente, caso se utilize marcação radioativa);

7) Via(s) e métodos de administração;

8) Frequência da administração;

9) Período de jejum (se for o caso);

10) Radioatividade total por animal;

11) Manipulação dos animais;

12) Colheita e tratamento das amostras;

13) Métodos analíticos utilizados na separação, quantificação e identificação de metabolitos;

14) Limites de deteção dos métodos utilizados;

15) Outras medições e protocolos experimentais utilizados (incluindo a validação dos métodos de análise dos metabolitos).

d) Análise estatística

Caso os resultados do estudo sejam objeto de análise estatística, devem incluir-se informações suficientes sobre o método de análise estatística e o programa informático utilizados para o efeito, para que um avaliador ou perito estatístico independente possa reexaminar e reconstituir a análise.

Se o estudo recorrer a modelos sistémicos, por exemplo, modelos toxicocinéticos de base fisiológica, os modelos utilizados devem ser descritos em pormenor, para que possam ser reconstituídos e validados de forma independente (ver o ponto 65 e o apêndice "Definições").

Resultados

71. Os dados devem ser resumidos e ser apresentados em quadros, juntamente com uma avaliação estatística adequada, e ser complementados por uma explicação no campo de texto correspondente. Os dados das contagens de radioatividade devem ser resumidos e ser apresentados da maneira mais adequada ao estudo – normalmente em microgramas ou miligramas equivalentes por massa de amostra, embora possam utilizar-se outras unidades. Devem inserir-se gráficos ilustrativos dos resultados, reproduzir-se os dados cromatográficos e espetrométricos representativos, identificar-se e quantificar-se os metabolitos, especificando a estrutura molecular dos mesmos, e propor-se as vias metabólicas correspondentes. Esta secção deve ainda conter os seguintes elementos que se justifiquem:

1) Quantidade e percentagem de recuperação de radioatividade na urina, nas fezes, no ar expirado e na lavagem (urina e fezes) da gaiola;

— nos estudos por via dérmica, devem incluir-se igualmente dados relativos à recuperação do produto químico em estudo na pele exposta e nas lavagens da pele, dados relativos à radioatividade residual na cobertura de proteção da pele e na unidade metabólica e os resultados do estudo de lavagem da pele. Para mais informações, ver os pontos 74 a 77,

▼M4

— nos estudos por via inalatória, devem incluir-se igualmente dados relativos à recuperação do produto químico em estudo nos pulmões e nos tecidos nasais (8). Para mais informações, ver o ponto 78;

2) Distribuição pelos tecidos, expressa em percentagem da dose administrada e em concentração (microgramas equivalentes por grama de tecido), e razões tecido/sangue e tecido/plasma;

3) Balanço de matérias referente a cada estudo no qual sejam analisados os tecidos corporais e as excreções;

4) Concentrações no plasma e parâmetros toxicocinéticos (biodisponibilidade, AUC, C_{max}, T_{max}, eliminação, meia vida) depois da administração pela(s) via(s) de exposição correspondente(s);

5) Taxa e grau de absorção do produto químico em estudo depois da administração pela(s) via(s) de exposição correspondente(s);

6) Quantidades do produto químico em estudo e de metabolitos (em percentagem da dose administrada) recolhidas nas excreções;

7) Referência aos dados por animal apresentados em apêndice para todos os parâmetros medidos (por exemplo, dose administrada, percentagem de recuperação, concentrações, parâmetros toxicocinéticos, etc.);

8) Figura com as vias metabólicas propostas e com as estruturas moleculares dos metabolitos.

Discussão e conclusões

72. Elementos a constar desta secção:

1) Proposta de via metabólica baseada nos resultados do metabolismo e da eliminação do produto químico em estudo;

2) Discussão das eventuais diferenças ligadas à espécie ou ao sexo no que respeita à eliminação e/ou biotransformação do produto químico em estudo;

3) Quadros e discussão relativos à identificação e importância dos metabolitos, às taxas de eliminação, ao potencial de bioacumulação e ao nível de resíduos do composto parental e/ou do(s) metabolito(s) deste nos tecidos, bem como a eventuais alterações dos parâmetros toxicocinéticos em função da dose;

4) Dados toxicocinéticos pertinentes obtidos em estudos de toxicidade;

5) Conclusão concisa, fundamentada nos resultados do estudo;

6) As subsecções suplementares eventualmente necessárias.

73. Pode inserir-se outras secções para incluir informações bibliográficas, quadros, figuras, apêndices, etc. complementares.

▼M4

VIAS ALTERNATIVAS DE EXPOSIÇÃO

Via dérmica

Exposição por via dérmica

74. Esta secção é dedicada aos estudos toxicocinéticos de produtos químicos administrados por via dérmica. No que respeita à absorção por esta via, consultar o capítulo B.44, "Absorção cutânea: método *in vivo*" (9) deste anexo. Para outros critérios, como a distribuição e o metabolismo, pode recorrer-se ao presente método. Na exposição por via dérmica pode utilizar-se um ou mais níveis de dose do produto químico em estudo. Este (por exemplo, o produto químico puro, uma diluição do mesmo ou uma formulação que o contenha, a aplicar na pele) deve ser o produto químico ao qual as pessoas ou outras espécies potencialmente afetadas poderão estar expostas, ou um substituinte realista do mesmo. O nível ou níveis de dose devem escolher-se conforme foi explicado nos pontos 20 a 26. São fatores a ter em conta na escolha da(s) dose(s) a administrar por via dérmica a exposição humana prevista e/ou as doses que se revelaram tóxicas noutros estudos de toxicidade por via dérmica. Se necessário, a dose ou doses a administrar por via dérmica devem ser dissolvidas num veículo adequado, sendo em seguida administrado(s) o(s) volume(s) adequado(s) da(s) dose(s). Pouco antes do início do ensaio, cortam-se os pelos da região dorsal dos animais. Caso se rapem os pelos com uma lâmina, esta operação deve ser efetuada cerca de 24 horas antes do ensaio. Ao cortar ou rapar os pelos do animal, é necessário tomar precauções para evitar lesões da pele que possam alterar a permeabilidade desta. A percentagem da superfície do corpo do animal da qual se devem eliminar os pelos para a aplicação do produto químico em estudo é de aproximadamente 10 %. Se o produto químico em causa for muito tóxico, a superfície exposta pode ser inferior a 10 %, mas deve cobrir-se com uma camada fina e uniforme o máximo possível de superfície. A superfície exposta deve ser a mesma para todos os grupos de animais que participam no ensaio por via dérmica. As superfícies expostas devem ser protegidas com uma cobertura adequada que não saia do lugar. Os animais devem ser alojados separadamente.

75. Para determinar a quantidade da dose do produto químico em estudo aplicada que pode remover-se da pele lavando a superfície de pele exposta com um sabão suave e água, efetua-se um estudo de lavagem da pele. Este estudo também pode ser útil para estabelecer o balanço de massas quando o produto químico for administrado por via dérmica. Para realizar um estudo de lavagem da pele, aplica-se uma dose única do produto químico em causa a dois animais. Escolhe-se a dose de acordo com o ponto 23 do presente método (relativamente ao tempo de contacto com a pele, ver o ponto 76). Para avaliar a eficácia da remoção do produto químico em estudo por este método de lavagem, determinam-se as quantidades do mesmo nas águas de lavagem.

76. A menos que a corrosividade o inviabilize, uma vez aplicado, o produto químico em estudo deve manter-se em contacto com a pele durante, pelo menos, seis horas. Uma vez retirada a cobertura de proteção, lava-se a superfície exposta conforme se explicou para o estudo de lavagem da pele no ponto 75. Em seguida, pesquisam-se resíduos do produto químico em estudo na cobertura de proteção e nas águas de lavagem. No final dos ensaios, eutanasiam-se os animais de acordo com a referência 2 e remove-se-lhes a pele exposta. Em seguida, analisa-se uma secção adequada dessa pele para determinar os resíduos do produto químico em estudo (a radioatividade) nela presentes.

77. Para a avaliação toxicocinética de produtos farmacêuticos, podem ser necessários protocolos diferentes, em observância da regulamentação aplicável.

▼M4

Via inalatória

78. Deve utilizar-se uma concentração única do produto químico em estudo, embora possam utilizar-se mais, se for necessário. A concentração ou concentrações devem escolher-se conforme foi explicado nos pontos 20 a 26. A exposição por inalação deve efetuar-se com um cone nasal ou com um capacete, para evitar absorções por outras vias (8). Se as condições de exposição por inalação forem diferentes, é necessário justificar e documentar as alterações. Deve precisar-se a duração da exposição (normalmente de quatro a seis horas).

REFERÊNCIAS:

(1) OCDE (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15. ENV/JM/MONO(2009)21, OCDE, Paris.

(2) OCDE (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000), OCDE, Paris.

(3) Solon E.G., Kraus L. (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance. *J. Pharm. and Tox. Methods* 46:73-81.

(4) Stumpf W.E. (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. *J. Pharmacological and Toxicological Methods* 51:25-40.

(5) Loizou G., Spendiff M., Barton H.A., Bessems J., Bois F.Y., d'Yvoire M.B., Buist H., Clewell H.J. 3rd, Meek B., Gundert-Remy U., Goerlitz G., Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 50:400 – 411.

(6) Capítulo B.45 deste anexo, "Absorção cutânea: Método *in vitro*".

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No. 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

(8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(9) Capítulo B.44 deste anexo, "Absorção cutânea: Método *in vivo*".

(10) Barton H.A., *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36:9-35.

(11) Gibaldi M., Perrier D., (1982), Pharmacokinetics, 2.ª edição. Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Apêndice

DEFINIÇÕES

***Absorção**:* processo ou processos através dos quais um produto químico atravessa tecidos ou neles penetra. Diz respeito ao composto parental e a todos os metabolitos deste. Não confundir com "biodisponibilidade".

***Acumulação** (bioacumulação):* aumento ao longo do tempo da quantidade do produto químico presente nos tecidos (em geral tecidos adiposos, após exposição repetida). Se a quantidade do produto químico que penetra no corpo exceder a quantidade que dele é eliminada, o produto químico acumula-se no organismo e pode atingir concentrações tóxicas.

***ADME**:* acrónimo de "Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção".

***AUC** (área abaixo da curva de concentração no plasma em função do tempo):* área abaixo da curva que representa a evolução da concentração do produto químico no plasma ao longo do tempo. Corresponde à quantidade do produto químico absorvida pelo corpo num período determinado. Em condições de linearidade, esta área (do tempo zero a infinito) é proporcional à quantidade total do produto químico absorvida pelo corpo, independentemente da taxa de absorção.

***Autorradiografia** (autorradiografia de corpo inteiro):* esta técnica, que serve para determinar quantitativa e/ou qualitativamente a localização nos tecidos de um produto químico radioativo, utiliza películas de raios X ou, mais recentemente, recorre à imagiologia digital com placas fotoluminescentes para visualizar moléculas ou fragmentos de moléculas com marcação radioativa através do registo da radiação emitida no interior do objeto estudado. Comparativamente à dissecação de órgãos, a autorradiografia quantitativa de corpo inteiro pode apresentar algumas vantagens na determinação da distribuição do produto químico em estudo e na avaliação da resolução e da recuperação total das matérias radioativas nos tecidos. Uma vantagem significativa, por exemplo, é que esta técnica pode ser utilizada num modelo com animais pigmentados para avaliar a eventual associação do produto químico em estudo à melanina, que pode ligar-se a certas moléculas. Todavia, embora constitua um meio cómodo de visualizar globalmente os sítios de fixação de grande capacidade e baixa afinidade em todo o corpo, esta técnica pode ter limitações na identificação de sítios-alvo específicos como os da fixação ao recetor, cuja deteção exige resolução e sensibilidade relativamente elevadas. Quando se recorre à autorradiografia, as experiências destinadas a estabelecer o balanço de massas do composto administrado devem realizar-se num grupo ou estudo distintos, separadamente do estudo da distribuição pelos tecidos, procedendo-se à homogeneização de todas as excreções (incluindo, eventualmente, o ar expirado) e das carcaças completas e à análise das mesmas por contagem da cintilação em fase líquida.

***Excreção biliar**:* excreção pelas vias biliares.

***Bioacumulação**:* ver "acumulação".

***Biodisponibilidade**:* fração de uma dose administrada que atinge a circulação sistémica ou é disponibilizada no sítio da atividade fisiológica. Em geral, a biodisponibilidade de um produto químico refere-se ao composto parental, mas pode igualmente referir-se a metabolitos deste. Diz respeito apenas a uma forma química. *Nota importante*: biodisponibilidade e absorção não são sinónimos. A diferença entre, por exemplo, a absorção oral (isto é, presença na parede intestinal e na circulação portal) e a biodisponibilidade (isto é, presença no sangue sistémico e nos tecidos) pode, entre outros fatores, advir da degradação química devida ao metabolismo da parede intestinal, ao efluxo para o lúmen intestinal ou ao metabolismo pré-sistémico no fígado (10). A biodisponibilidade do componente tóxico (composto parental ou metabolito) é um parâmetro essencial na avaliação dos riscos para a saúde humana (extrapolação de doses elevadas para doses baixas, extrapolação de uma via para outra) para a determinação do valor interno correspondente a um NOAEL (nível sem observação de efeitos adversos) externo ou a uma dose de referência externa (dose aplicada). Para estudar os efeitos no fígado em caso de administração oral, é suficiente a absorção oral. Todavia, para estudar efeitos não localizados na porta de entrada, a biodisponibilidade é geralmente um parâmetro mais fiável para a avaliação dos riscos do que a absorção.

***Biopersistência**:* ver "persistência".

***Biotransformação**:* conversão química (geralmente enzimática) no corpo do produto químico em causa num produto químico diferente. É sinónimo de "metabolismo".

▼M4

C_{max}: concentração máxima (pico de concentração) no sangue (plasma/soro) após a administração ou excreção máxima (pico de excreção urinária ou fecal) após a administração.

Velocidade de eliminação: medição quantitativa da taxa, por unidade de tempo, à qual o produto químico em estudo é removido do sangue, do plasma ou de determinado tecido.

Compartimento: porção (ou unidade) estrutural ou bioquímica de um corpo, tecido ou célula separada do resto do corpo, do resto do tecido ou do resto da célula.

Vias de desintoxicação: séries de etapas conducentes à eliminação de produtos químicos tóxicos do corpo, seja por transformação metabólica seja por excreção.

Distribuição: dispersão de um produto químico e dos seus derivados num organismo.

Enzimas/isozimas: proteínas que catalisam reações químicas. As isozimas são enzimas que catalisam reações químicas semelhantes, mas diferem na sequência de aminoácidos.

Parâmetros enzimáticos: K_m, constante de Michaelis; e V_{max}, velocidade máxima.

Excreção: processo ou processos através dos quais um produto químico administrado e/ou os metabolitos deste são eliminados do corpo.

Exógeno: de origem exterior ao organismo ou sistema ou produzido fora dele.

Extrapolação: inferência de um ou mais valores desconhecidos com base no que é conhecido ou se observou.

Meia vida ($t_{1/2}$): tempo necessário para que a concentração do produto químico em estudo num compartimento diminua para metade. Refere-se geralmente à concentração no plasma ou à quantidade do produto químico em estudo presente em todo o corpo.

Indução/Indução enzimática: síntese de enzimas em resposta a um estímulo ambiental ou a uma molécula indutora.

Linearidade/Cinética linear: um processo diz-se de cinética "linear" se todas as transferências entre compartimentos forem proporcionais às quantidades ou concentrações presentes, isto é, forem de primeira ordem. Os volumes de eliminação e de distribuição, bem como as meias-vidas, são, portanto, constantes. As concentrações atingidas são proporcionais à dose (exposição) e a acumulação é mais facilmente previsível. Pode aferir-se da linearidade/não linearidade comparando os parâmetros pertinentes — por exemplo, a área abaixo da curva — após doses diferentes ou após uma exposição única e repetidas exposições. A inexistência de uma dependência da dose pode indicar a saturação das enzimas que intervêm no metabolismo do composto em causa; o aumento da área abaixo da curva após exposição repetida, comparativamente a uma exposição única, pode indicar inibição metabólica; a diminuição da área abaixo da curva pode indicar indução metabólica (ver também a referência 11).

▼M4

***Balanço de massas**:* contabilidade das entradas e saídas do sistema do produto químico em estudo.

***Balanço material**:* ver "balanço de massas".

***Mecanismo (modo) de toxicidade/Mecanismo (modo) de ação**:* o mecanismo de ação refere-se às interações bioquímicas específicas através das quais o produto químico em estudo produz os seus efeitos. O modo de ação refere-se aos fenómenos mais gerais através dos quais se manifesta a toxicidade do produto químico.

***Metabolismo**:* é sinónimo de "biotransformação".

***Metabolitos**:* produtos do metabolismo ou de processos metabólicos.

***Absorção oral**:* percentagem da dose do produto químico em estudo absorvida a partir do sítio de administração (trato gastrointestinal). Este parâmetro essencial pode servir para compreender que fração do produto químico administrado atinge a veia porta e, a seguir, o fígado.

***Coeficiente de partição**:* também conhecido por "coeficiente de distribuição", mede a diferença de solubilidades do produto químico em dois solventes.

***Níveis sanguíneos (plasmático/sérico) máximos**:* concentração máxima (pico de concentração) no sangue (plasma/soro) após a administração do produto químico (ver também "C_{max}").

***Persistência (biopersistência)**:* presença duradoura de um produto químico (num sistema biológico) devido a resistência deste à degradação/eliminação.

***Interpolação**:* utilização dos dados relativos a um determinado parâmetro disponíveis para um ou mais produtos químicos na previsão do resultado referente ao mesmo parâmetro para o produto químico em estudo.

***Autorradiografia microscópica dos recetores** (ou microautorradiografia dos recetores):* técnica que pode servir para estudar interações xenobióticas com determinados sítios de tecidos ou populações celulares, por exemplo, em estudos de fixação ao recetor ou de modo de ação específico que possam necessitar de resolução e sensibilidade elevadas, impossíveis de obter por técnicas como a autorradiografia de corpo inteiro.

***Via de administração** (oral, intravenosa, dérmica, inalatória, etc.):* refere-se aos meios pelos quais os produtos químicos são administrados ao corpo (por exemplo, por via oral através de sonda esofágica, por via oral através da dieta, por via dérmica, por inalação, por via intravenosa, etc.).

***Saturação**:* estado no qual um ou mais processos cinéticos (por exemplo, a absorção, o metabolismo ou a eliminação) estão no máximo (ou seja, saturados).

***Sensibilidade**:* capacidade de um método ou de um instrumento de distinguir medições correspondentes a níveis diferentes de resposta da variável em causa.

***Estado estacionário dos níveis sanguíneos (plasmáticos)**:* estado fora do equilíbrio de um sistema aberto no qual todas as forças exercidas no sistema são exatamente contrabalançadas por forças opostas, de maneira que todos os componentes do sistema têm uma concentração estacionária, embora fluam matérias pelo sistema.

***Modelação sistémica** (modelo toxicocinético de base fisiológica, modelo de base farmacocinética, modelo farmacocinético de base fisiológica, modelo de base biológica, etc.):* modelo abstrato que utiliza linguagem matemática para descrever o comportamento de um sistema.

***Tecidos-alvo**:* tecido no qual se manifesta o principal efeito adverso do produto tóxico.

▼**M4**

***Produto químico em estudo**:* qualquer produto químico ou mistura ao qual seja aplicado este método de ensaio.

***Distribuição nos tecidos**:* circulação reversível do produto químico em estudo de um ponto para outro do corpo. Esta distribuição pode estudar-se por dissecação, homogeneização, combustão ou contagem da cintilação em fase líquida dos órgãos ou por autorradiografia qualitativa e/ou quantitativa de corpo inteiro. A primeira via é útil para determinar concentrações e percentagens de recuperação em tecidos e na restante carcaça de um animal, mas pode não ter resolução suficiente em todos os tecidos e a recuperação global pode não ser a ideal (< 90 %). Ver abaixo a definição da outra via.

T_{max}*:tempo necessário para atingir* C_{max}.

***Toxicocinética** (farmacocinética):* Estudo de absorção, da distribuição, do metabolismo e da excreção de produtos químicos ao longo do tempo.

***Validação de modelos**:* processo de avaliar se um modelo descreve convenientemente os dados toxicocinéticos disponíveis. Pode avaliar-se modelos por comparação estatística ou visual, com valores experimentais, das previsões que permitem fazer, em função de uma variável independente comum (por exemplo, o tempo). A amplitude da avaliação deve ser compatível com a utilização pretendida do modelo.

▼B

B.37. NEUROTOXICIDADE RETARDADA DE SUBSTÂNCIAS ORGANOFOSFORADAS POR EXPOSIÇÃO AGUDA

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

Na determinação e avaliação dos efeitos tóxicos das substâncias deve ter-se em conta o potencial de certos grupos, de determinarem tipos específicos de neurotoxicidade não detectáveis noutros ensaios de toxicidade. Verifica-se, assim, que algumas substâncias organofosforadas induzem neurotoxicidade retardada, constituindo potenciais alvos para avaliação.

Os ensaios de rastreio *in vitro* podem ser utilizados para identificar substâncias susceptíveis de induzir polineuropatias retardadas; todavia, a obtenção de resultados negativos nos ensaios *in vitro* não comprova que as referidas substâncias não possuem efeitos neurotóxicos.

Ver a parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

As *substâncias organofosforadas* incluem os ésteres, tioésteres e anidridos não ionizados de ácidos organofosfóricos, organofosfónicos e organofosforamídicos ou de ácidos fosforotióicos, fosfonotióicos e fosforotioamídicos afins, bem como quaisquer outras substâncias que possam causar o tipo de neurotoxicidade retardada que se observa por vezes nas referidas classes de substâncias.

Neurotoxicidade retardada é o síndroma associado à manifestação retardada de ataxia e de axonopatias distais na espinal medula e nos nervos periféricos, bem como à inibição e à redução da actividade da esterase envolvida na neuropatia, presente no tecido nervoso.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Pode utilizar-se uma substância de referência com um lote de controlo positivo, de modo a demonstrar que, nas condições de ensaio, não existe uma alteração significativa da reacção da espécie em causa.

O fosfato de tris-*o*-tolilo [n.º CAS: 78-30-8; n.º EINECS: 201-103-5; designado éster tris (2-metilfe-nílico) do ácido fosfórico na nomenclatura CAS e também conhecido por fosfato de tris-*o*-cresilo] constitui uma substância neurotóxica largamente utilizada.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância em estudo é administrada por via oral, numa única dose, a galinhas domésticas eventualmente protegidas de efeitos colinérgicos agudos. Os animais são observados durante 21 dias, registando-se a manifestação de quaisquer perturbações do comportamento, bem como de ataxia e paralisia. As determinações bioquímicas, nomeadamente da inibição da esterase envolvida na neuropatia, são efectuadas com aves seleccionadas de modo aleatório em cada lote, em geral 24 e 48 horas após a administração. 21 dias após a exposição, procede-se ao abate dos restantes animais, seguido do exame histopatológico de determinados tecidos do sistema nervoso.

▼B

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.5.1. **Preparação**

Seleccionam-se de modo aleatório galinhas adultas, jovens e saudáveis, isentas de afecções virais e medicação concomitantes, bem como de anomalias da marcha, que se repartem pelos lotes de ensaio e de controlo. Os animais são aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias antes do início do ensaio.

Devem utilizar-se gaiolas ou recintos cujas dimensões permitam a livre mobilidade das aves e a fácil observação da respectiva marcha.

A substância em estudo é administrada por via oral, por intermédio de uma sonda gástrica, de cápsulas de gelatina ou de um método comparável. Os líquidos podem ser administrados sem diluição ou dissolvidos num veículo adequado, nomeadamente óleo de milho; os sólidos devem ser dissolvidos sempre que possível, uma vez que a absorção de doses elevadas de sólidos dispersos em cápsulas de gelatina poderá não ser eficaz. No caso de se utilizar um veículo não aquoso, devem conhecer-se, ou determinar-se antes do ensaio, as respectivas características de toxicidade.

1.5.2. **Condições de ensaio**

1.5.2.1. *Animais de ensaio*

Recomenda-se a utilização de galinhas poedeiras, adultas e jovens (*Gallus gallus domesticus*), com idades compreendidas entre 8 e 12 meses. Devem utilizar-se raças e variedades correntes, mantendo-se os animais em condições que permitam a sua livre mobilidade.

1.5.2.2. *Número e sexo*

Além do lote de ensaio, devem utilizar-se um lote de controlo com o veículo e um lote de controlo positivo. Os animais incluídos no lote de controlo com o veículo devem ser tratados de modo análogo aos animais do lote de ensaio, omitindo-se apenas a administração da substância em estudo.

Deve utilizar-se um número suficiente de animais em cada lote, de modo a que possam ser abatidos pelo menos seis animais para as determinações bioquímicas (três em dois momentos diferentes), sobrevivendo seis para o período de observação de 21 dias.

Pode efectuar-se um controlo positivo em paralelo ou, como alternativa, utilizar dados obtidos em controlos positivos anteriores. O lote de controlo positivo deve ser constituído por um mínimo de seis aves a que se administra uma substância com actividade neurotóxica retardada conhecida, destinando-se três animais às determinações bioquímicas e os restantes a observação. Recomenda-se a actualização periódica dos dados obtidos. Caso um laboratório altere algum elemento essencial do protocolo experimental (por exemplo, variedade de animais utilizada, condições de alimentação ou alojamento), deve efectuar-se novo controlo positivo.

▼B

1.5.2.3. *Doses*

Para estabelecer a dose a utilizar no ensaio, deve realizar-se um estudo prévio com um número adequado de aves e de doses, que poderá implicar a morte de alguns animais. Todavia, de modo a evitar a mortalidade devida a efeitos colinérgicos agudos, pode utilizar-se atropina ou outro agente protector que se saiba não interferir com as reacções neurotóxicas retardadas. Na estimativa da dose máxima não letal da substância em estudo podem utilizar-se diversos métodos de ensaio (ver o método B.1.*bis*).

A dose de substância em estudo a utilizar no ensaio deve ser tão elevada quanto possível, em função dos resultados do estudo prévio de selecção, não excedendo 2 000 mg/kg de massa corporal. O número de animais mortos durante o ensaio não deve interferir com o número mínimo de animais a utilizar para as determinações bioquímicas e para o exame histopatológico a 21 dias (seis em ambos os casos). De modo a evitar a mortalidade devida a efeitos colinérgicos agudos, pode utilizar-se atropina ou outro agente protector que se saiba não interferir com as reacções neurotóxicas retardadas.

1.5.2.4. *Ensaio-limite*

Sempre que um ensaio, realizado de acordo com o presente método, que utilize uma dose de, pelo menos, 2 000 mg/kg de massa corporal/dia, não produza efeitos tóxicos observáveis, ou se, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não se preveja o surgimento de efeitos tóxicos, poderá não ser necessário efectuar um ensaio com uma dose mais elevada. Nestes casos, justifica-se a realização de um ensaio-limite, excepto se a exposição humana indicar a necessidade de recurso a uma dose superior.

1.5.2.5. *Período de observação*

O período de observação deve ser de 21 dias.

1.5.3 **Procedimento**

Após a administração de um agente destinado a evitar a mortalidade devida a efeitos colinérgicos agudos, administra-se a substância em estudo numa única dose.

1.5.3.1. *Observações gerais*

Devem iniciar-se as observações logo após a administração da substância. Os animais devem ser cuidadosamente observados várias vezes nos dois dias subsequentes à administração e pelo menos diariamente até perfazer o período de 21 dias ou até ao abate previsto. Devem registar-se todos os sinais de toxicidade, incluindo o momento da manifestação, o tipo, a gravidade e a duração das anomalias de comportamento. A ataxia deve determinar-se de acordo com uma escala numérica constituída por um mínimo de quatro níveis, devendo também registar-se os casos de paralisia. Pelo menos duas vezes por semana, devem retirar-se das gaiolas os animais seleccionados para observação patológica, submetendo-os a um período de actividade motora forçada, nomeadamente a subida de uma escada, de modo a facilitar a observação de efeitos tóxicos mínimos. Os animais moribundos, bem como aqueles que mostrem sinais de dor e sofrimento intensos, devem ser removidos, abatidos por intervenção humana e autopsiados.

▼B

1.5.3.2. *Massa corporal*

As aves devem ser pesadas imediatamente antes da administração da substância em estudo e, pelo menos, uma vez por semana na sequência da mesma.

1.5.3.3. *Determinações bioquímicas*

Alguns dias após a administração da substância, devem abater-se seis aves seleccionadas de modo aleatório dos lotes de ensaio e de controlo com o veículo, bem como três aves do lote de controlo positivo (caso este último seja efectuado em paralelo), preparando-se os respectivos cérebros e espinais medulas com vista a determinar a inibição da actividade da esterase envolvida na neuropatia. Além disso, pode também revelar-se útil preparar, para o mesmo fim, tecidos provenientes dos nervos ciáticos. Em geral, abatem-se três animais do lote de controlo e de cada lote de ensaio 24 horas após a administração da substância e três 48 horas após a mesma; os três animais dos lotes de controlo positivos devem ser abatidos 24 horas após a administração. Caso os sinais clínicos de intoxicação (que pode ser avaliada em função do momento da manifestação dos efeitos colinérgicos) observados indicarem que o agente tóxico é eliminado de forma bastante lenta, poderá ser preferível recolher tecidos de três animais em dois momentos compreendidos entre 24 horas e, no máximo, 72 horas após a administração.

Se for caso disso, podem também efectuar-se determinações de acetilcolinesterase com as amostras em causa. Todavia, a possível ocorrência *in vivo* de reactivação espontânea da mesma poderá levar a subestimar a capacidade de inibição da acetilcolinesterase da substância em estudo.

1.5.3.4. *Autópsia*

A autópsia dos animais abatidos (abates previstos e abates de animais moribundos) deve incluir o exame macroscópico do cérebro e da espinal-medula.

1.5.3.5. *Exame histopatológico*

O tecido nervoso dos animais sobreviventes após o período de observação, que não for utilizado para as determinações bioquímicas deve ser objecto de exame microscópico. Os tecidos devem ser fixados *in situ*, por recurso a técnicas de perfusão. As secções a examinar incluem o cerebelo (ao nível meio-longitudinal), a *medulla oblongata*, a espinal medula e os nervos periféricos. Devem recolher-se secções da espinal medula provenientes do segmente cervical superior e das regiões mediotorácica e lombo-sagrada. Devem também recolher-se secções provenientes da região distal do nervo tibial e das respectivas ramificações para o músculo gastroenémio, bem como do nervo ciático. As secções em causa devem ser coradas com corantes adequados à mielina e corantes específicos dos axónios.

2. **DADOS**

A obtenção de resultados negativos para os parâmetros bioquímicos, histopatológicos e de comportamento investigados no âmbito do presente ensaio não implica, de modo geral, a realização de ensaios complementares de neurotoxicidade retardada. A obtenção de resultados duvidosos ou não conclusivos poderá requerer a realização de estudos complementares.

Devem registar-se os dados relativos a cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, referindo-se, para cada lote de ensaio, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentam lesões e alterações de comportamento ou dos parâmetros bioquímicos, bem como o tipo e a gravidade das referidas lesões, e a percentagem de animais que apresentam cada tipo de lesões e alterações, em função da respectiva gravidade.

▼B

Os resultados do ensaio devem ser avaliados em termos de incidência, gravidade e correlação das alterações de comportamento, bem como dos efeitos bioquímicos, histopatológicos e outros efeitos observados nos lotes de ensaio e de controlo.

Sempre que possível, os resultados numéricos devem ser avaliados por recurso a um método estatístico de aceitação geral, cuja escolha deve ser efectuada na fase de concepção do ensaio.

3. **RELATÓRIO**

RELATÓRIO DO ENSAIO

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

3.1. Animais utilizados no ensaio:

— estirpe utilizada;

— número e idade dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, etc.;

— massa de cada animal no início do ensaio.

3.2. Condições de ensaio:

— pormenores relativos à preparação da substância em estudo e à respectiva estabilidade e homogeneidade, se for caso disso;

— justificação da escolha do veículo;

— pormenores relativos à administração da substância em estudo;

— pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água;

— motivo da selecção da dose utilizada;

— especificação das doses administradas, incluindo pormenores relativos ao veículo, bem como ao volume utilizado e às características físicas da substância administrada;

— identidade do agente protector eventualmente utilizado e pormenores relativos à respectiva administração.

3.3. Resultados:

— dados relativos à massa corporal;

— consumo de alimentos e de água, se for caso disso;

— reacções tóxicas observadas em cada lote, incluindo a mortalidade;

— natureza, gravidade e duração dos sinais clínicos (reversíveis ou não);

— descrição pormenorizada dos ensaios bioquímicos realizados e respectivos resultados;

— dados obtidos por autópsia;

— descrição pormenorizada dos resultados do exame histopatológico;

— tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

O presente método é análogo ao método OCDE TG 418.

▼B

B.38. **NEUROTOXICIDADE RETARDADA DE SUBSTÂNCIAS ORGANOFOSFORADAS POR ADMINISTRAÇÃO REPETIDA A 28 DIAS**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

Na determinação e avaliação dos efeitos tóxicos das substâncias deve ter-se em conta o potencial de certas classes das mesmas de determinarem tipos específicos de neurotoxicidade não detectáveis noutros ensaios de toxicidade. Verifica-se, assim, que algumas substâncias organofosforadas induzem neurotoxicidade retardada, constituindo potenciais alvos para avaliação.

Os ensaios de rastreio *in vitro* podem ser utilizados para identificar substâncias susceptíveis de induzir polineuropatias retardadas; todavia, a obtenção de resultados negativos nos ensaios *in vitro* não comprova que as referidas substâncias não possuem efeitos neurotóxicos.

O presente ensaio de toxicidade retardada a 28 dias fornece informações sobre os eventuais riscos para a saúde decorrentes da exposição repetida num período limitado, nomeadamente a relação dose administrada-efeito, bem como uma estimativa das doses sem efeitos observados, a utilizar no estabelecimento de critérios de segurança na exposição à substância.

Ver a parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

As *substâncias organofosforadas* incluem os ésteres, tioésteres e anidridos não ionizados de ácidos organofosfóricos, organofosfónicos e organofosforamídicos ou de ácidos fosforotióicos, fosfonotióicos e fosforotioamídicos afins, bem como quaisquer outras substâncias que possam causar o tipo de neurotoxicidade retardada que se observa por vezes nas referidas classes de substâncias.

Neurotoxicidade retardada é a síndrome associada à manifestação retardada de ataxia e de axonopatias distais na espinal medula e nos nervos periféricos, bem como à inibição e a redução da actividade da esterase envolvida na neuropatia, presente no tecido nervoso.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância em estudo é administrada por via oral a galinhas domésticas, durante 28 dias. Os animais são observados pelo menos diariamente, registando-se a manifestação de quaisquer perturbações do comportamento, bem como de ataxia e paralisia, até 14 dias após a administração da última dose. As determinações bioquímicas, nomeadamente da inibição da esterase envolvida na neuropatia, são efectuadas com aves seleccionadas de modo aleatório em cada lote, em geral 24 e 48 horas após a administração da última dose. Duas semanas após esta última, procede-se ao abate dos restantes animais, seguido do exame histopatológico de determinados tecidos do sistema nervoso.

▼B

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.4.1. **Preparação**

Seleccionam-se de modo aleatório galinhas adultas, jovens e saudáveis, isentas de afecções virais e medicação concomitantes, bem como de anomalias da marcha, que se repartem pelos lotes de ensaio e de controlo. Os animais são aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias antes do início do ensaio.

Devem utilizar-se gaiolas ou recintos cujas dimensões permitam a livre mobilidade das aves e a fácil observação da respectiva marcha.

A substância em estudo é administrada por via oral, por intermédio de uma sonda gástrica, de cápsulas de gelatina ou de um método comparável. Os líquidos podem ser administrados sem diluição ou dissolvidos num veículo adequado, nomeadamente óleo de milho; os sólidos devem ser dissolvidos sempre que possível, uma vez que a absorção de doses elevadas de sólidos dispersos em cápsulas de gelatina poderá não ser eficaz. No caso de se utilizar um veículo não aquoso, devem conhecer-se, ou determinar-se antes do ensaio, as respectivas características de toxicidade.

1.4.2. **Condições de ensaio**

1.4.2.1. *Animais de ensaio*

Recomenda-se a utilização de galinhas poedeiras, adultas e jovens (*Gallus gallus domesticus*), com idade compreendida entre 8 e 12 meses. Devem utilizar-se raças e variedades correntes, mantendo-se os animais em condições que permitam a sua livre mobilidade.

1.4.2.2. *Número e sexo*

Devem utilizar-se pelo menos três lotes de ensaio e um lote de controlo com o veículo. Os animais incluídos no lote de controlo com o veículo devem ser tratados de modo análogo aos animais do lote de ensaio, omitindo-se apenas a administração da substância em estudo.

Deve utilizar-se um número suficiente de animais em cada lote, de modo a que possam ser abatidos pelo menos seis animais para as determinações bioquímicas (três em dois momentos diferentes), sobrevivendo seis para o período de observação de 14 dias após a administração da última dose.

1.4.2.3. *Doses*

Na selecção das doses devem ter-se em conta os resultados dos ensaios de neurotoxicidade retardada por administração aguda, bem como quaisquer outros dados disponíveis em matéria de toxicidade e cinética referentes à substância em causa. A dose mais elevada deve ser escolhida com o objectivo de induzir efeitos tóxicos, nomeadamente de neurotoxicidade retardada, evitando contudo a morte e o sofrimento intenso. Posteriormente, deve seleccionar-se uma sequência decrescente de doses, com o objectivo de evidenciar uma correlação entre a dose administrada e a reacção observada, bem como a ausência de efeitos nocivos associados à administração da dose mais reduzida.

▼B

1.4.2.4. *Ensaio-limite*

Sempre que um ensaio, realizado de acordo com o presente método, que utilize uma dose de, pelo menos, 1 000 mg/kg de massa corporal/dia, não produza efeitos tóxicos observáveis, ou se, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não se preveja a manifestação de efeitos tóxicos, poderá não ser necessário efectuar um ensaio com uma dose mais elevada. Nestes casos, justifica-se a realização de um ensaio-limite, excepto se a exposição humana indicar a necessidade de recurso a uma dose superior.

1.4.2.5. *Período de observação*

Os animais devem ser observados com uma frequência pelo menos diária no decurso do período de exposição e nos 14 dias subsequentes à administração da última dose, salvo no caso de se proceder a autópsias intermédias.

1.4.3. **Procedimento**

Deve administrar-se a substância aos animais sete dias por semana, num período de 28 dias.

1.4.3.1. *Observações gerais*

Devem iniciar-se as observações logo após a administração da primeira dose. Os animais devem ser cuidadosamente observados com uma frequência diária mínima, no decurso do período de exposição e nos 14 dias subsequentes à administração da última dose, ou até ao abate previsto. As observações devem incluir, nomeadamente, as anomalias de comportamento. A ataxia deve determinar-se de acordo com uma escala numérica constituída por um mínimo de quatro níveis, devendo também registar-se os casos de paralisia. Pelo menos duas vezes por semana, devem retirar-se das gaiolas os animais seleccionados para observação patológica, submetendo-os a um período de actividade motora forçada, nomeadamente a subida de uma escada, de modo a facilitar a observação de efeitos tóxicos mínimos. Os animais moribundos, bem como aqueles que mostrem sinais de dor e sofrimento intensos, devem ser removidos, abatidos por intervenção humana e autopsiados.

1.4.3.2. *Massa corporal*

As aves devem ser pesadas imediatamente antes da administração da primeira dose e, pelo menos, uma vez por semana na sequência da mesma.

1.4.3.3. *Determinações bioquímicas*

Alguns dias após a administração da última dose, devem abater-se seis aves seleccionadas de modo aleatório dos lotes de ensaio e de controlo com o veículo, preparando-se os respectivos cérebros e espinais medulas com vista a determinar a inibição da actividade da esterase envolvida na neuropatia. Além disso, pode também revelar-se útil preparar, para o mesmo fim, tecidos provenientes dos nervos ciáticos. Em geral, abatem-se três animais do lote de controlo e de cada lote de ensaio 24 horas após a administração da última dose e três 48 horas após a mesma. Podem utilizar-se outros intervalos de abate, apresentando a respectiva justificação, caso os dados provenientes de ensaios de toxicidade aguda ou de outro tipo de estudos (nomeadamente de toxicocinética) mostrem que esses intervalos são mais adequados.

Se for caso disso, podem também efectuar-se determinações de acetilcolinesterase com as amostras em causa. Todavia, a possível ocorrência *in vivo* de reactivação espontânea da mesma poderá levar a subestimar a capacidade de inibição da acetilcolinesterase da substância em estudo.

▼B

1.4.3.4. *Autópsia*

A autópsia dos animais abatidos (abates previstos e abates de animais moribundos) deve incluir o exame macroscópico do cérebro e da espinal medula.

1.4.3.5. *Exame histopatológico*

O tecido nervoso dos animais sobreviventes após o período de observação que não for utilizado para as determinações bioquímicas deve ser objecto de exame microscópico. Os tecidos devem ser fixados *in situ,* por recurso a técnicas de perfusão. As secções a examinar incluem o cerebelo (ao nível meio-longitudinal), a *medulla oblongata,* a espinal medula e os nervos periféricos. Devem recolher-se secções da espinal medula provenientes do segmento cervical superior e das regiões médio-torácica e lombo-sagrada. Devem também recolher-se secções provenientes da região distal do nervo tibial e das respectivas ramificações para o músculo gastroenémio, bem como do nervo ciático. As secções em causa devem ser coradas com corantes adequados à mielina e corantes específicos dos axónios. Inicialmente, o exame microscópico deve abranger apenas os tecidos conservados dos animais do lote de controlo e do lote a que foi administrada a dose mais elevada; se, neste último caso, se observarem efeitos tóxicos, deve efectuar-se também o exame microscópico dos tecidos provenientes dos animais dos lotes a que foram administradas doses reduzidas e intermédias.

2. **DADOS**

A obtenção de resultados negativos para os parâmetros bioquímicos, histopatológicos e de comportamento investigados no âmbito do presente ensaio não implica, de modo geral, a realização de ensaios complementares de neurotoxicidade retardada. A obtenção de resultados duvidosos ou não conclusivos poderá requerer a realização de estudos complementares.

Devem registar-se os dados relativos a cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, referindo-se, para cada lote de ensaio, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentem lesões e alterações de comportamento ou dos parâmetros bioquímicos, bem como o tipo e a gravidade das referidas lesões, e a percentagem de animais que apresentam cada tipo de lesões e alterações, em função da respectiva gravidade.

Os resultados do ensaio devem ser avaliados em termos de incidência, gravidade e correlação das alterações de comportamento, bem como dos efeitos bioquímicos, histopatológicos e outros efeitos observados nos lotes de ensaio e de controlo.

Sempre que possível, os resultados numéricos devem ser avaliados por recurso a um método estatístico de aceitação geral, cuja escolha deve ser efectuada na fase de concepção do ensaio.

3. **RELATÓRIO**

RELATÓRIO DO ENSAIO

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

3.1. Animais utilizados no ensaio:

— estirpe utilizada;

— número e idade dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, etc.;

— massa de cada animal no início do ensaio.

▼B

3.2. Condições de ensaio:

— pormenores relativos à preparação da substância em estudo e à respectiva estabilidade e homogeneidade, se for caso disso;

— justificação da escolha do veículo;

— pormenores relativos à administração da substância em estudo;

— pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água;

— motivo da selecção das doses utilizadas;

— especificação das doses administradas, incluindo pormenores relativos ao veículo, bem como ao volume utilizado e às características físicas da substância administrada;

— motivos da selecção de outros intervalos para as determinações bioquímicas que não 24 ou 48 horas após a administração da última dose.

3.3. Resultados:

— dados relativos à massa corporal;

— reacções tóxicas observadas por dose administrada, incluindo a mortalidade;

— nível sem efeitos adversos observáveis;

— natureza, gravidade e duração dos sinais clínicos (reversíveis ou não);

— descrição pormenorizada dos ensaios bioquímicos realizados e respectivos resultados;

— dados obtidos por autópsia;

— descrição pormenorizada dos resultados do exame histopatológico;

— tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

O presente método é análogo ao método OCDE TG 419.

▼B

B.39. ENSAIO *IN VIVO* DA SÍNTESE NÃO PROGRAMADA (UDS) DE ADN EM CÉLULAS DO FÍGADO DE MAMÍFEROS

1. MÉTODO

O presente método é idêntico ao método OCDE TB 486 — Ensaio *in vivo* da síntese não programada (UDS) de ADN em células do fígado de mamíferos (1997).

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo do ensaio *in vivo* da síntese não programada (UDS) de ADN em células do fígado de mamíferos é identificar as substâncias que induzem a reparação do ADN nas células do fígado de animais expostos à substância em estudo (1) (2) (3) (4).

O presente ensaio *in vivo* apresenta um método para investigação dos efeitos dos produtos químicos genotóxicos sobre o fígado. O valor limite medido é indicativo dos danos e da subsequente reparação do ADN em células do fígado. O fígado é geralmente o local principal de metabolização dos compostos absorvidos, pelo que é particularmente apropriado para avaliar os danos do ADN *in vivo*.

Se existirem provas de que nem a substância em estudo nem nenhum dos seus metabolitos reactivos entram em contacto com o tecido objectivo, o presente ensaio não é apropriado.

O ponto final da síntese não programada (UDS) de ADN é medido através da determinação da incorporação de nucleótidos marcados por células que não se encontram numa fase de síntese programada de ADN (fase S). A técnica mais utilizada é a determinação da incorporação de timidina marcada com trítio (^{3}H-TdR) por autoradiografia. Nos ensaios UDS *in vivo* são geralmente utilizados fígados de rato. Podem também ser utilizados outros tecidos, mas não é esse o objectivo do presente método.

A detecção de uma resposta UDS depende do número de bases do ADN excizadas e substituídas no local danificado. Por conseguinte, o ensaio UDS é particularmente válido para a detecção de «reparação de cadeias longas» (20-30 bases) induzida pela substância. A «reparação de cadeias curtas» (1-3 bases) é, pelo contrário, detectada com uma sensibilidade muito mais baixa. Além disso, podem existir eventos mutagénicos decorrentes da não reparação, reparação incorrecta ou de problemas de replicação das lesões do ADN. A extensão da resposta UDS não dá qualquer indicação em relação à fidelidade do processo de reparação. Além disso, é possível que um agente mutagéneo reaja com o ADN mas que os danos do ADN não sejam posteriormente reparados através de um processo de reparação da excisão. A ausência de informação específica sobre a actividade mutagénica do ensaio UDS é compensada pela potencial sensibilidade do seu ponto final, uma vez que é medido na totalidade do genoma.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

Células em reparação: apresentam uma granulação nuclear líquida (NNG) superior a um valor pré-determinado, a justificar pelo laboratório que conduz o ensaio.

Granulação nuclear líquida (NNG): medida quantitativa da actividade celular UDS em ensaios autoradiográficos UDS, calculada pela subtracção do número médio de grânulos citoplásmicos em sectores citoplásmicos equivalentes ao núcleo (CG) ao número de grânulos nucleares (NG): NNG = NG — CG. As contagens NNG são calculadas para cada célula e são depois ponderadas para as células de uma cultura, em culturas paralelas, etc.

▼B

Síntese não programada (UDS) de ADN: síntese de reparação do ADN após excisão e remoção de uma sequência de ADN que contém uma região danificada por indução de substâncias químicas ou de agentes físicos.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O ensaio UDS *in vivo* em células do fígado de mamíferos indica a ocorrência de uma síntese de reparação do ADN após excisão e remoção de uma sequência de ADN que continha uma região danificada por indução de substâncias químicas ou de agentes físicos. O ensaio baseia-se geralmente na incorporação de ^{3}H-TdR no ADN de células do fígado com uma baixa proporção de células na fase S do ciclo celular. A incorporação de ^{3}H-TdR é geralmente determinada por autoradiografia, uma vez que esta técnica não é tão sensível à interferência das células em fase S como, por exemplo, a contagem de cintilação em meio líquido.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.4.1. **Preparação**

1.4.1.1. *Selecção das espécies animais*

Geralmente são utilizados ratos, embora possa ser utilizada qualquer outra espécie de mamífero apropriada. Devem ser utilizados animais adultos saudáveis jovens das raças de laboratório mais comuns. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder ± 20 % do peso médio de cada sexo.

1.4.1.2. *Condições de acomodação e alimentação*

Devem ser aplicadas as condições gerais referidas na Introdução Geral, parte B, embora o objectivo para a humidade deva ser de 50 %-60 %.

1.4.1.3. *Preparação dos animais*

Os animais adultos saudáveis jovens são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. As gaiolas devem ser dispostas de modo a que eventuais efeitos devidos à respectiva colocação sejam minimizados. Os animais são identificados de forma inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias antes de se iniciar o estudo.

1.4.1.4. *Preparação das doses*

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes de serem administradas aos animais. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e/ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2. **Condições do ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/veículo*

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, não devendo produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente/veículo aquoso.

▼B

1.4.2.2. *Controlos*

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo). Com excepção da exposição à substância em estudo, todos os animais, incluindo os dos grupos de controlo, devem ser manuseados de forma idêntica.

Os controlos positivos devem ser substâncias comprovadamente causadoras de UDS quando administradas aos níveis de exposição a que se espera o surgimento de um aumento detectável em relação à linha de base. Os controlos positivos que exijam activação metabólica devem ser utilizados em doses que desencadeiem uma resposta moderada (4). A dose de controlo positiva a administrar deve ser escolhida de modo a que os seus efeitos sejam claros mas também a que as lâminas codificadas não sejam imediatamente identificadas pela pessoa que procede às leituras. As substâncias de controlo positivo podem incluir, por exemplo:

Tempo de amostragem	Substância	Número CAS	Número EINECS
Amostragens iniciais (2-4 horas)	N-nitrosodimetilamina	62-75-9	200-249-8
Amostragens finais (12-16 horas)	N-2-fluorenilacetamida (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Podem ser utilizadas outras substâncias de controlo positivo apropriadas. O controlo positivo pode ser administrado por uma via diferente da substância em estudo.

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. **Número e sexo de animais**

Deve ser utilizado um número de animais suficiente para que a variação biológica natural seja tomada em consideração nos resultados do ensaio, com pelo menos três animais analisáveis por grupo. Se já existir uma base de dados históricos significativa, os grupos de controlo positivo e negativo poderão conter apenas um ou dois animais.

Se no momento do estudo existirem dados disponíveis de estudos com as mesmas espécies e com utilização da mesma via de administração que demonstrem que não há qualquer diferença substancial de toxicidade entre os sexos, será suficiente testar um único sexo, de preferência o sexo masculino. Nos casos em que a exposição humana aos produtos químicos possa ser específica a cada sexo, como acontece com alguns produtos farmacêuticos, o ensaio deve ser executado com animais do sexo em causa.

1.5.2. **Programação do tratamento**

As substâncias de ensaio são preferivelmente administradas numa única exposição.

1.5.3. **Doses**

Normalmente, são utilizadas pelo menos duas doses diferentes. A dose mais elevada é definida como a dose que produz sinais de toxicidade tais que indiquem que a utilização de doses superiores, com o mesmo regime de administração, produzirá mortalidade. Em termos gerais, a dose inferior deve ser de 25 %-50 % da dose mais elevada.

▼B

As substâncias com actividade biológica específica em doses baixas e não tóxicas (como acontece com as hormonas e agentes mitogénicos) poderão constituir uma excepção aos critérios de fixação da dose, devendo ser avaliadas caso a caso. Se for realizado um estudo para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados, esse estudo deve ser executado no mesmo laboratório, utilizando as mesmas espécies, linha celular, sexo e regime de exposição a utilizar no estudo principal.

A dose mais elevada pode igualmente ser definida como uma dose que produz algumas indicações de toxicidade no fígado (por exemplo, núcleos picnóticos).

1.5.4. **Ensaio-limite**

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2 000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se não for previsível a existência de toxicidade genética com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, poderá não ser considerado necessário um estudo completo. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios-limite.

1.5.5. **Administração das doses**

A substância em estudo é geralmente administrada por sonda esofágica, utilizando um tubo estomacal ou cânula de intubação apropriada. Poderão ser aceites, mediante justificação, outras vias de administração, mas a via intraperitoneal não é recomendada, uma vez que poderá expor o fígado à substância em estudo directamente e não através do sistema circulatório. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez por sonda esofágica ou por injecção depende também do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes mais elevados deve ser justificada. Com excepção das substâncias que causem irritação ou que sejam corrosivas, cujos efeitos serão normalmente agravados em concentrações mais altas, a variabilidade do volume de ensaio deve ser minimizada através do ajustamento das concentrações, por forma a garantir um volume constante para todas as doses a administrar.

1.5.6. **Preparação das células de fígado**

As células do fígado são normalmente preparadas a partir dos animais expostos à substância em estudo 12-16 horas após a administração da substância em estudo. Geralmente será necessário realizar uma primeira amostra (normalmente 2-4 horas após a exposição), que só não terá de ser utilizada quando haja uma resposta positiva clara às 12-16 horas. Contudo, podem ser utilizados outros tempos de amostragem, desde que sejam justificados com base em dados toxicocinéticos.

As culturas celulares de curta duração do fígado de mamíferos são geralmente preparadas irrigando o fígado *in situ* com colagenase e deixando que algumas células livres separadas do fígado há pouco tempo se fixem a uma superfície apropriada. As células do fígado de animais do controlo negativo devem ter uma viabilidade de pelo menos 50 % (5).

1.5.7. **Determinação da UDS**

As células de fígado de mamífero isoladas há pouco tempo são geralmente incubadas num meio que contém ^{3}H-TdR durante um período adequado, por exemplo 3-8 horas. No final do período de incubação, as células são lavadas para remover o meio residual e depois incubadas num meio com excesso de timidina não rotulada para diminuir a radioactividade não incorporada («lavagem a frio»). As células são então enxaguadas, fixadas e secas. Para os tempos de incubação mais prolongados, pode não ser necessária a lavagem a frio. As lâminas são mergulhadas na emulsão autoradiográfica, expostas na obscuridade (ou seja, refrigeradas durante 7-14 dias), reveladas e coradas, após o que se procede à contagem dos grânulos de prata expostos. Devem ser preparadas duas ou três lâminas de cada animal.

▼B

1.5.8. **Análise**

As preparações devem conter um número suficiente de células com morfologia normal para permitir uma avaliação significativa da UDS. As preparações são examinadas microscopicamente para sinais de citotoxicidade evidente (por exemplo, picnose, níveis diminuídos de radiação proveniente da timina rotulada).

As lâminas devem ser codificadas antes da contagem dos grânulos. Normalmente são contadas 100 células de cada animal, de pelo menos duas lâminas; se forem contadas menos de 100 células/animal, deve ser fornecida uma justificação. As contagens dos grânulos dos núcleos em fase S não são tomadas em consideração, mas a proporção de células em fase S pode ser registada.

O grau de incorporação da ^{3}H-TdR nos núcleos e citoplasma das células morfologicamente normais, evidenciado pelo depósito de grânulos de prata, deve ser determinado por métodos apropriados.

As contagens de grânulos são determinadas nos núcleos (grânulos nucleares, NG) e em sectores do citoplasma equivalentes ao núcleo (grânulos citoplásmicos, CG). As contagens de CG são feitas no sector do citoplasma mais rotulado ou fazendo a média de dois ou três locais com grânulos citoplásmicos escolhidos aleatoriamente junto à região do núcleo. Outros métodos de contagem (por exemplo, contagem de células inteiras) podem ser utilizados, se se justificarem (6).

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Devem ser apresentados dados relativos a cada lâmina e a cada animal. Para além disso, todos os dados devem ser apresentados sob a forma de um quadro. As contagens de granulação nuclear líquida (NNG) devem ser calculadas para cada célula, para cada animal, para cada dose e para cada tempo de colheita subtraindo as contagens CG das contagens NG. Se forem contadas as «células em reparação», os critérios para definir essas células devem ser justificados e baseados em dados históricos ou dos controlos negativos realizados em paralelo com o ensaio. Os resultados numéricos podem ser avaliados através de métodos estatísticos. Os métodos estatísticos a utilizar eventualmente devem ser escolhidos e justificados antes da realização do estudo.

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os exemplos de critérios para a definição de uma resposta como positiva/negativa incluem:

positiva
- i) Valores de NNG positivos, acima de um limiar pré-definido justificado com base nos dados históricos do laboratório; ou
- ii) Valores de NNG significativamente superiores aos do controlo em paralelo;

negativa
- i) Valores de NNG iguais/inferiores ao limiar de controlo histórico; ou
- ii) Valores de NNG não significativamente superiores aos do controlo em paralelo.

▼B

A importância biológica dos dados deve ser considerada, ou seja, devem ser tomados em consideração parâmetros como a variação de animal para animal, a relação dose/resposta e a citotoxicidade. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos, embora a significância estatística não deva ser o único elemento para a determinação de uma resposta positiva.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio UDS em células do fígado de mamíferos *in vivo* indica que a substância em estudo induz danos no ADN das células do fígado de mamíferos *in vivo* que podem ser reparados por síntese não programada de ADN *in vitro*. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz danos no ADN que sejam detectáveis pelo presente ensaio.

Deve ser discutida a probabilidade de a substância em estudo ou os seus metabolitos alcançarem o sistema circulatório geral ou especificamente o tecido objectivo (ou seja, a toxicidade sistémica).

3. **APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS**

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

— justificação para a escolha do veículo,

— solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/-veículo, se conhecida.

Animais de ensaio:

— espécie/linha celular utilizada,

— número, idade e sexo dos animais,

— origem, condições de acomodação, alimentação, etc.,

— peso de cada animal no início do ensaio, incluindo a gama de pesos, a respectiva média e o desvio-padrão para cada grupo.

Condições de ensaio:

— controlos positivos e negativos veículo/solvente,

— resultados do estudo para definição da gama de doses, quando tenha sido realizado,

— justificação para a selecção das doses,

— preparação da substância em estudo,

— modo de administração da substância em estudo,

— justificação da via de administração escolhida,

— métodos usados para verificar se o agente em estudo atingiu o sistema circulatório geral, caso tenham sido utilizados,

▼B

— conversão da concentração da substância em estudo na alimentação/abeberação (ppm) para a dose real (mg/kg peso corporal/dia), quando aplicável,

— qualidade dos alimentos e da água,

— descrição pormenorizada dos calendários de tratamento e amostragem,

— métodos de medição da toxicidade,

— método de preparação e cultura das células do fígado,

— técnica de autoradiografia utilizada,

— número de lâminas preparadas e número de células contabilizadas,

— critérios de avaliação,

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo.

Resultados:

— valores médios das contagens de grânulos nucleares, grânulos citoplásmicos e da granulação nuclear líquida para cada lâmina, animal e grupo,

— relação dose-resposta, quando seja possível de determinar,

— análise estatística, quando tenha sido realizada,

— sinais de toxicidade,

— dados relativos aos controlos positivos e negativos (solvente/-veículo) realizados em paralelo com o ensaio,

— dados históricos relativos aos controlos positivos e negativos (solvente/veículo) realizados em paralelo com o ensaio, com as respectivas gama, valor médio e desvio-padrão,

— número de células «em reparação», caso tenham sido contabilizadas,

— número de células em fase S, caso tenham sido contadas,

— viabilidade das células.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G., (1985) An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. Mutation Res., 156, p. 1-18.

(2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G., (1987) A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. Mutation Res. 189, p. 123-133.

(3) Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G., (1993) *In Vivo* Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, p. 52-77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H., (1993) Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*. Mutation Res., 312, p. 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C., (1993) Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS). Mutation Res., 291, p. 21-27.

(6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E., (1982) Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. Environ. Mutagen, 4, p. 553-562.

▼B

B.40. CORROSÃO DA PELE *IN VITRO*: ENSAIO DA RESISTÊNCIA ELÉCTRICA TRANSCUTÂNEA (RET)

1. MÉTODO

Este método de ensaio é equivalente ao OECD TG 430 (2004).

1.1. INTRODUÇÃO

Entende-se por corrosão da pele a produção de danos irreversíveis nos tecidos cutâneos por aplicação de uma matéria em estudo (definida de acordo com o sistema harmonizado global de classificação e rotulagem das misturas e substâncias químicas) (1). O presente método permite determinar a corrosividade sem recorrer a animais vivos.

A determinação da corrosividade cutânea tem normalmente feito uso de animais de laboratório (2). A preocupação com a dor e o sofrimento inerentes a esse processo levou à revisão do método de ensaio B.4, tendo passado a ser possível determinar a corrosão da pele por métodos alternativos (*in vitro*), que evitam a dor e o sofrimento de animais.

A primeira etapa com vista à definição de ensaios alternativos que pudessem ser utilizados na determinação da corrosividade cutânea num contexto legislativo foi a realização de estudos de pré-validação (3). Seguidamente, foi realizado um estudo com vista à validação formal de métodos *in vitro* para a determinação da corrosão da pele (4) (5) (6) (7) (8). O resultado desses estudos e outra literatura publicada conduziram à recomendação de que poderiam ser utilizados para determinar a corrosividade cutânea *in vivo* (9) (10) (11) o ensaio em modelos de pele humana (ver o método de ensaio B.40.A) e o presente ensaio (ensaio da resistência eléctrica transcutânea).

Um estudo de validação e outros estudos publicados concluíram que o ensaio da resistência eléctrica transcutânea (RET) em pele de rato (12) (13) permite distinguir com fiabilidade as substâncias reconhecidamente corrosivas da pele das que o não são (5) (9).

O ensaio descrito no presente método permite identificar misturas e substâncias químicas corrosivas. Permite igualmente identificar misturas e substâncias químicas não-corrosivas, quando associado a outras informações disponíveis (por exemplo, pH, relações estrutura-actividade, dados humanos ou em animais) que corroborem tais características (1) (2) (11) (14). O método não dá informações sobre a irritação da pele, nem permite dividir as substâncias corrosivas em categorias (como as previstas no sistema de classificação harmonizado global) (1).

Para uma avaliação completa dos efeitos locais na pele após uma exposição única por via dérmica recomenda-se a aplicação da estratégia de ensaio sequencial apensa ao método de ensaio B.4 (2) e associada ao sistema harmonizado global (1). Essa estratégia de ensaio inclui a realização de ensaios de corrosão da pele (descritos no presente método) e de irritação da pele *in vitro* antes de ser ponderada a realização de ensaios em animais vivos.

▼B

1.2. DEFINIÇÕES

Corrosão da pele *in vivo*: Produção de danos irreversíveis à pele, nomeadamente a necrose visível da epiderme, prolongando-se para a derme, após a aplicação de uma substância em estudo durante um máximo de quatro horas. São exemplos típicos de reacções corrosivas as úlceras, hemorragias e escaras sanguinolentas e, para o final do período de observação de 14 dias, a descoloração, devido à perda de pigmentação da pele, a formação de zonas de alopecia total e a ocorrência de cicatrizes. As lesões duvidosas poderão ser esclarecidas por métodos histopatológicos.

Resistência eléctrica transcutânea (RET): Valor da resistência em kΩ medido para a impedância eléctrica da pele. Trata-se de um método simples e robusto de avaliação da função de barreira por meio do registo do fluxo iónico através da pele com uma ponte de Wheatstone.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Quadro 1

Substâncias químicas de referência

Denominação	Número EINECS	Número CAS	
1,2-Diaminopropano	201-155-9	78-90-0	Extremamente corrosivo
Ácido acrílico	201-177-9	79-10-7	Extremamente corrosivo
2-terc-Butilfenol	201-807-2	88-18-6	Corrosivo
Hidróxido de potássio (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Corrosivo
Ácido sulfúrico (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Corrosivo
Ácido octanóico (ácido caprílico)	204-677-5	124-07-02	Corrosivo
4-Amino-1,2,4-triazole	209-533-5	584-13-4	Não corrosivo
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Não corrosivo
Brometo de fenetilo	203-130-8	103-63-9	Não corrosivo
Tetracloroetileno	204-825-9	27-18-4	Não corrosivo
Ácido isoesteárico	250-178-0	30399-84-9	Não corrosivo
4-(Metiltio)-benzaldeído	222-365-7	3446-89-7	Não corrosivo

A maioria das substâncias químicas constantes do quadro foi retomada da lista seleccionada para o estudo de validação internacional do ECVAM (4). A selecção baseia-se nos seguintes critérios:

i) Número idêntico de substâncias corrosivas e não corrosivas;

▼B

ii) Substâncias disponíveis no comércio e da maioria das classes químicas pertinentes;

iii) Inclusão de substâncias extremamente corrosivas e de substâncias menos corrosivas, para possibilitar uma diferenciação com base no poder corrosivo;

iv) Escolha de substâncias químicas que podem ser manuseadas no laboratório sem outros perigos graves além da corrosividade.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Aplica-se a matéria em estudo, durante 24 horas, sobre a superfície epidérmica de discos cutâneos num sistema de ensaio com dois compartimentos, no qual o disco estabelece a separação entre os compartimentos. Os discos cutâneos são retirados de ratos com 28 a 30 dias de idade, mortos sem crueldade. As matérias corrosivas são identificadas pela sua capacidade de causarem uma perda da integridade normal do *stratum corneum* e da função de barreira, perda essa que é medida pela descida da RET abaixo de um determinado limite (12). Para determinação da RET na pele do rato, foi seleccionado um valor-limite de 5 kΩ, com base numa multiplicidade de dados obtidos com uma vasta gama de substâncias químicas, situando-se a grande maioria dos valores claramente muito acima (frequentemente > 10 kΩ) ou muito abaixo (frequentemente < 3 kΩ) desse valor (12). Em geral, as matérias não corrosivas para os animais, mas simplesmente irritantes (ou não irritantes), não reduzem a RET abaixo daquele valor-limite. A utilização de outras preparações cutâneas ou de outros equipamentos pode alterar o valor-limite, necessitando da correspondente validação.

O método inclui uma etapa de ligação de um corante, para a confirmação dos resultados positivos na determinação da RET (incluindo próximos de 5 kΩ). A etapa de ligação do corante esclarece se o aumento de permeabilidade iónica se deve à destruição física do *stratum corneum.* O método de determinação da RET em pele de rato revelou-se capaz de prever a corrosividade *in vivo* no coelho, determinada pelo método de ensaio B.4 (2). De referir que o ensaio *in vivo* da corrosividade para a pele e da irritação da pele no coelho é fortemente conservador, comparativamente ao ensaio do emplastro cutâneo em pessoas (15).

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

7.5.7. **Os animais**

O rato é a espécie escolhida por ter sido demonstrada a sensibilidade da pele desses animais às substâncias químicas utilizadas no ensaio (10). A linhagem e idade do rato (no momento da colheita da pele) assumem particular importância, devendo os folículos pilosos encontrar-se na fase de dormência, antes do crescimento da pilosidade adulta.

▼B

Com uma pequena tosquiadora, cortam-se cuidadosamente os pêlos dorsais e dos flancos de ratos fêmeas ou machos jovens (linhagem Wistar ou comparável), com aproximadamente 22 dias de idade. Os animais são depois lavados, esfregando cuidadosamente, devendo a zona tosquiada da pele ser mergulhada numa solução antibiótica (contendo, por exemplo, estreptomicina, penicilina, cloranfenicol e anfotericina em concentrações suficientes para inibir o crescimento bacteriano). Os animais voltam a ser lavados com solução antibiótica no terceiro ou quarto dia após a primeira lavagem e são utilizados nos três dias seguintes à segunda lavagem, quando o *stratum corneum* tiver recuperado da tosquia.

1.5.2. **Preparação dos discos cutâneos**

Os animais são mortos sem crueldade entre a idade de 28 e 30 dias (esta idade é muito importante). Em seguida, retira-se a pele dorsal lateral dos animais e remove-se a gordura subcutânea em excesso, raspando cuidadosamente. Cortam-se discos cutâneos de aproximadamente 20 mm de diâmetro. A pele pode ser guardada antes da utilização dos discos, desde que se demonstre que os dados de controlo (positivos e negativos) são equivalentes aos obtidos com pele fresca.

Cada disco cutâneo é colocado numa das extremidades de um tubo de politetrafluoroetileno (PTFE), com a superfície epidérmica em contacto com o tubo. A pele é bem fixada na extremidade do tubo com uma anilha tórica tensa de borracha, eliminando-se o tecido em excesso. As dimensões do tubo e da anilha são as indicadas na figura 2. A anilha é a seguir envolvida em vaselina, de forma a garantir a estanquidade da sua união com o tubo de PTFE. O tubo é depois suspenso, com uma tampa-suporte de molas, dentro de uma câmara receptora com uma solução de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) 154 mM (figura 1). O disco cutâneo deve ficar totalmente imerso na solução de $MgSO_4$. Cada pele de rato pode fornecer de 10 a 15 discos cutâneos.

Como procedimento de controlo de qualidade, antes de se iniciar o ensaio mede-se a resistência eléctrica de dois discos cutâneos de cada pele de animal. Para que os restantes discos possam ser utilizados no ensaio, ambos os discos devem permitir obter valores de resistência superiores a 10 kΩ. Se o valor da resistência for inferior a 10 kΩ os discos restantes da pele em causa serão rejeitados.

1.5.3. **Aplicação das substâncias em estudo e de controlo**

Para garantir a adequabilidade do modelo experimental, devem utilizar-se em paralelo, em cada estudo, uma amostra de controlo positiva e uma amostra de controlo negativa. Devem ser utilizados para o efeito discos cutâneos de um só animal. Como substâncias de controlo sugerem-se o ácido clorídrico 10 M (positivo) e a água destilada (negativo).

As substâncias em estudo líquidas são aplicadas uniformemente (150 µl) na superfície epidérmica no interior do tubo. Quando a matéria ensaiada for sólida, aplicar-se-á uniformemente no disco uma quantidade suficiente da mesma, de modo a cobrir toda a superfície epidérmica. Em seguida, deita-se água desionizada (150 µl) por cima do sólido e agita-se suavemente o tubo. Para garantir um contacto máximo com a pele, pode ser necessário aquecer as matérias sólidas a 30 °C, para fundir ou amolecer a substância em estudo, ou moê-las, para produzir um pó ou granulado.

▼B

Para cada substância em estudo e substância de controlo serão utilizados três discos cutâneos. A substância em estudo é aplicada a uma temperatura compreendida entre 20 ºC e 23 ºC durante 24 horas. Em seguida, a substância em estudo é removida por lavagem em água corrente a uma temperatura máxima de 30 ºC, até remoção completa.

1.5.4. **Medições de RET**

Mede-se a impedância (RET) da pele utilizando uma ponte de Wheatstone de baixa tensão de corrente alternada (13). As especificações gerais da ponte de Wheatstone são as seguintes: tensão operacional de 1 V a 3 V, corrente alternada sinusoidal ou rectangular de 50 Hz a 1 000 Hz e gama de medição de pelo menos 0,1 kΩ a 30 kΩ. A ponte utilizada no estudo de validação media valores de indutância, capacitância e resistência até 2 000 H, 2 000 μF e 2 MΩ, respectivamente, a frequências de 100 Hz ou 1 kHz, utilizando valores em série ou em paralelo. Para o ensaio RET de corrosividade, as medições são registadas em resistência, à frequência de 100 Hz, utilizando valores em série. Antes da medição da resistência eléctrica, reduz-se a tensão superficial da pele adicionando um volume de etanol a 70 % suficiente para cobrir toda a epiderme. Após alguns segundos, remove-se o etanol do tubo e hidrata-se o tecido adicionando 3 ml de solução de sulfato de magnésio 154 mM. Para medir a resistência do disco cutâneo em kΩ, colocam-se os eléctrodos da ponte de Wheatstone de cada um dos lados do disco (figura 1). As dimensões dos eléctrodos e o comprimento de cada eléctrodo abaixo da pinça tipo crocodilo são indicados na figura 2. A pinça aplicada ao eléctrodo interno deve ficar apoiada no rebordo do tubo de PTFE durante a medição da resistência, de forma a garantir que o comprimento de eléctrodo mergulhado na solução de sulfato de magnésio seja constante. O eléctrodo externo deve ser colocado dentro da câmara receptora de forma a tocar no fundo da mesma. A distância entre a tampa-suporte de molas (*spring clip*) e o fundo do tubo de PTFE deve ser mantida constante (figura 2), porque afecta o valor de resistência medido. A distância entre o eléctrodo interno e o disco cutâneo deve ser mínima (1 mm a 2 mm) e constante.

Se o valor de resistência medido exceder 20 kΩ, tal pode dever-se à presença de restos da substância em estudo na superfície epidérmica do disco cutâneo. Para eliminar essas matérias, poderá, por exemplo, tapar-se o tubo de PTFE com o polegar, usando luvas de borracha, e agitar-se durante cerca de 10 segundos. Rejeita-se a solução de sulfato de magnésio e repete-se a medição da resistência com solução fresca de $MgSO_4$.

As propriedades e dimensões da montagem de ensaio e o procedimento experimental aplicado podem influenciar os valores de RET obtidos. O limite de corrosão de 5 kΩ foi estabelecido a partir de dados obtidos com a montagem e segundo os procedimentos especificamente descritos no presente método. Poderão ser aplicáveis outros valores-limite e de controlo se as condições de ensaio forem alteradas ou for utilizada uma montagem diferente. É, portanto, necessário calibrar a metodologia e os valores-limite de resistência ensaiando uma série de padrões de referência seleccionados das substâncias químicas utilizadas no estudo de validação (4) (5), ou de classes químicas similares às das substâncias químicas em estudo. Figuram no quadro 1 uma série de substâncias químicas adequadas.

▼B

1.5.5. **Métodos da ligação de corante**

A exposição a determinadas matérias não corrosivas pode originar uma redução da resistência para valores inferiores ao limite de 5 kΩ, ao permitir a passagem de iões através do *stratum corneum,* que se traduz numa redução da resistência eléctrica (5). Determinados compostos orgânicos neutros e substâncias químicas tensioactivas (detergentes, emulsionantes e outras substâncias tensioactivas), por exemplo, podem remover os lípidos cutâneos, daí resultando uma maior permeabilidade iónica da barreira. Por esta razão, se os valores de RET das substâncias em estudo forem inferiores a 5 kV ou próximos deste limite, sem que haja danos visíveis, deve ser efectuada uma avaliação da penetração de um corante nos tecidos de controlo e nos tecidos tratados, para determinar se os valores de RET obtidos se deveram a uma maior permeabilidade cutânea ou à corrosão da pele (3) (5). Neste último caso, se o *stratum corneum* estiver danificado, o corante sulforrodamina B, uma vez aplicado na superfície da pele, penetrará rapidamente e colorará o tecido subjacente. Este corante específico é estável a uma grande variedade de substâncias químicas e não é afectado pelo processo de extracção acima referido.

1.5.5.1. *Aplicação e eliminação do corante sulforrodamina B*

Depois da determinação da RET, a solução de sulfato de magnésio é removida do tubo e verifica-se cuidadosamente se a pele apresenta danos evidentes. Se a pele não apresentar danos importantes evidentes, aplica-se um volume de 150 µl de uma solução a 10 % (m/v) de corante sulforrodamina B (vermelho ácido 52; C.I. 45100; n.º EINECS 222-529-8; n.º CAS 3520-42-1), em água destilada, à superfície epidérmica de cada disco cutâneo, durante duas horas. Lavam-se em seguida os discos em água corrente, à temperatura ambiente, durante cerca de 10 segundos, a fim de remover o corante em excesso/não fixado. Retiram-se cuidadosamente os discos cutâneos de cada tubo de PTFE e colocam-se num recipiente (por exemplo, um frasco de vidro de 20 ml) com água desionizada (8 ml). Agitam-se cuidadosamente os frascos durante 5 minutos, para remover os restos de corante que eventualmente não se tenham fixado. Repete-se este procedimento de lavagem e transferem-se os discos cutâneos para frascos que contenham 5 ml de uma solução a 30 % (m/v) de dodecilsulfato de sódio em água destilada, incubando-se a 60 ºC de um dia para o outro.

Depois da incubação, os discos cutâneos são retirados e rejeitados e a solução remanescente em cada frasco é centrifugada durante 8 minutos a 21 ºC (força relativa de centrifugação: ~175 x g). Dilui-se então 1:5 (v/v- ou seja, 1 ml + 4 ml) uma amostra de 1 ml do líquido sobrenadante com uma solução a 30 % (m/v) de dodecilsulfato de sódio em água destilada. Mede-se a densidade óptica da solução resultante a 565 nm.

1.5.5.2. *Cálculo da concentração de corante*

A concentração do corante sulforrodamina B por disco é calculada a partir dos valores de densidade óptica (5) (coeficiente de extinção molar do corante sulforrodamina B a 565 nm = 8,7 $x10^4$; massa molecular = 580). Utilizando uma curva de calibração apropriada, determina-se a concentração de corante correspondente a cada disco cutâneo, calculando-se em seguida uma concentração média de corante para os replicados.

2. **RESULTADOS**

Os valores de resistência (em kΩ) e os valores médios da concentração de corante (µg/disco), se for caso disso, correspondentes à matéria em estudo e às amostras de controlo positiva e negativa devem ser apresentados num quadro recapitulativo de resultados individuais e de médias ± desvio-padrão (incluindo resultados dos replicados/repetições e os valores individuais e médios).

▼B

2.1. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os valores médios de RET obtidos serão aceites se os valores das amostras de controlo positiva e negativa correspondentes se encontrarem dentro dos intervalos aceitáveis para o método no laboratório de ensaio. Os intervalos de resistência aceitáveis para o método e a montagem acima descritos são indicados no quadro seguinte:

Amostra de controlo	Substância	Intervalo de resistência (kΩ)
Positiva	Ácido clorídrico 10 M	0,5-1,0
Negativa	Água destilada	10-25

Os valores médios obtidos para a ligação do corante serão aceites se os valores das amostras de controlo correspondentes se encontrarem dentro dos intervalos aceitáveis para o método. Os intervalos aceitáveis de concentração de corante que se sugerem para as substâncias de controlo, para o método e a montagem acima descritos, são indicados no quadro seguinte:

Amostra de controlo	Substância	Intervalo de concentração de corante (μg/disco)
Positiva	Ácido clorídrico 10 M	40-100
Negativa	Água destilada	15-35

A substância em estudo será considerada não corrosiva da pele:

i) Se o valor médio de RET obtido para a substância em estudo exceder 5 kΩ, ou

ii) Se o valor médio de RET foi inferior ou igual a 5 kΩ, e

— o disco cutâneo não apresentar danos evidentes, e

— a concentração média de corante do disco for bastante inferior à concentração média de corante do disco da amostra de controlo positiva de HC1 10 M correspondente.

A substância em estudo será considerada corrosiva da pele:

i) Se o valor médio de RET foi inferior ou igual a 5 kΩ e o disco cutâneo apresentar danos evidentes, ou

ii) Se o valor médio de RET foi inferior ou igual a 5 kΩ, e

— o disco cutâneo não apresentar danos evidentes, mas

— a concentração média de corante do disco for igual ou superior à concentração média de corante do disco da amostra de controlo positiva de HC1 10 M correspondente.

▼B

3. **RELATÓRIOS**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Substâncias em estudo e de controlo:

— Denominação ou denominações químicas (como as denominações IUPAC ou CAS e o n.º CAS, se forem conhecidos);

— Grau de pureza e composição da substância ou preparação (em percentagem ponderai), natureza física;

— Propriedades físico-químicas (estado físico, pH, estabilidade, hidrossolubilidade) relevantes para o estudo;

— Tratamento das substâncias em estudo/de controlo antes do ensaio, se for o caso (por exemplo, aquecimento, moagem);

— Estabilidade, se for conhecida.

Animais utilizados no ensaio:

— Linhagem e sexo utilizados;

— Idade dos animais no momento em que foram dadores;

— Proveniência, condições de alojamento, alimentação, etc.;

— Pormenores sobre a preparação da pele.

Condições de ensaio:

— Curvas de calibração da montagem de ensaio;

— Curvas de calibração para o ensaio de ligação do corante;

— Pormenores sobre o método de ensaio utilizado na medição das RET;

— Pormenores sobre o método de ensaio utilizado na medição da ligação do corante, se tiver sido o caso;

— Descrição de eventuais modificações dos métodos de ensaio;

— Descrição dos critérios de avaliação utilizados.

Resultados:

— Quadro recapitulativo dos resultados dos ensaios de determinação das RET e da ligação do corante (se tiver sido o caso), por animal e amostra de pele;

— Descrição dos efeitos eventualmente observados.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OECD, (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

▼B

(2) Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/-Corrosion.

(3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M., (1995) A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, p. 219-255.

(4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P., (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxicology *In Vitro* 12, p. 471-482.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M., (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, p. 483-524.

(6) OECD, (1996) Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, p. 62

(7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem. J.H., Bruner. L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder. R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski. D., Spielmann, H., and Zucco, F., (1995) Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, p. 129-147.

(8) ICCVAM, (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)., (1997) Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf

(9) ECVAM, (1998) ECVAM News & Views. ATLA 26, p. 275--280.

(10) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)., (2002) ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

(11) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st - 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

(12) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C., (1986) An *in vitro* skin corrosivity test -modificationsand validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, p. 507-512.

▼B

(13) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J., (1992) The skin corrosivity test *in vitro:* results of an interlaboratory trial. Toxic. *In Vitro* 6, p. 191-194.

(14) Worth A.P., Fentem J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile D.J., Liebsch, M., (1998) An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, p. 709-720.

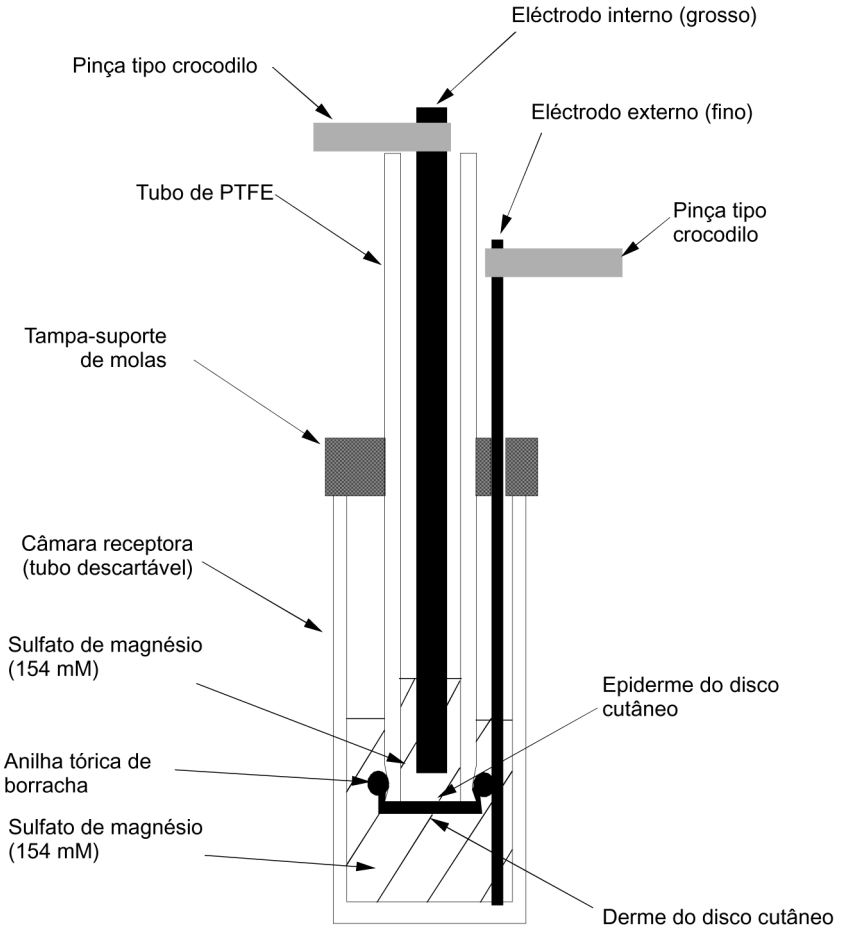
(15) Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M., (1997) The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, p. 845-852.

(16) Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C., (1988) An *In Vitro* model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. Toxicology *In Vitro*. 2, p. 7-17.

▼B

Figura 1

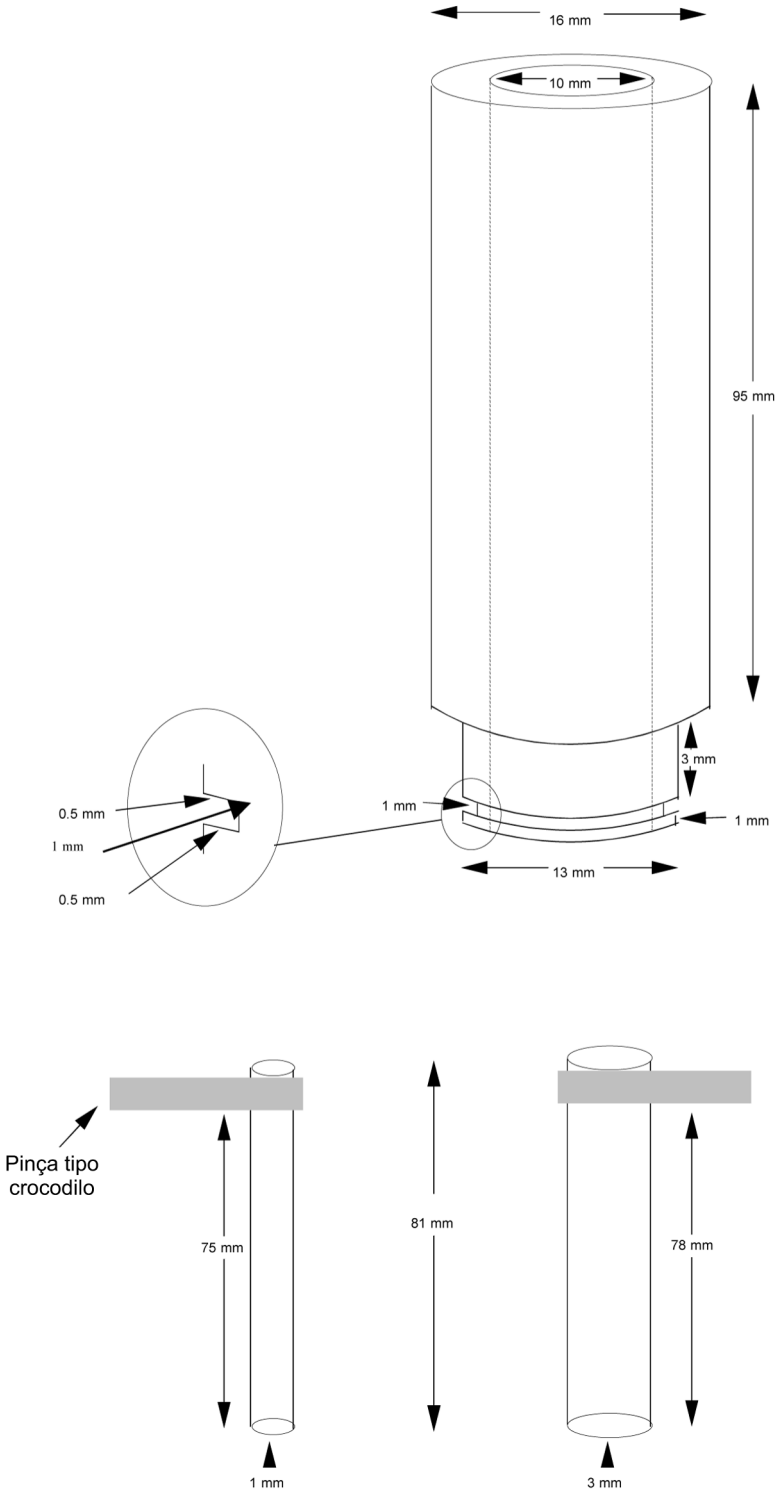
Montagem para o ensaio da RET em pele de rato



▼B

Figura 2

Dimensões do tubo de politetrafluoroetileno (PTFE) e do tubo receptor, bem como dos eléctrodos utilizados



▼B

Factores críticos da montagem ilustrada:

— Diâmetro interno do tubo de PTFE;

— Comprimento dos eléctrodos em relação ao tubo de PTFE e ao tubo receptor, para que os eléctrodos não toquem no disco cutâneo e de modo que um comprimento fixo de eléctrodo esteja em contacto com a solução de $MgSO_4$;

— A quantidade de solução de $MgSO_4$ no tubo receptor deve proporcionar um nível de líquido, em relação ao nível no tubo de PTFE, conforme o ilustrado na figura 1;

— O disco cutâneo deve ser convenientemente fixado ao tubo de PTFE, para que a resistência eléctrica seja uma medida fiável das propriedades da pele.

▼B

B.40.A. CORROSÃO DA PELE *IN VITRO*: ENSAIO EM MODELOS DE PELE HUMANA

1. MÉTODO

Este método de ensaio é equivalente ao OECD TG 431 (2004).

1.1. INTRODUÇÃO

Entende-se por corrosão da pele a produção de danos irreversíveis nos tecidos cutâneos por aplicação de uma matéria em estudo (definida de acordo com o sistema harmonizado global de classificação e rotulagem das misturas e substâncias químicas) (1). O presente método de ensaio não requer a utilização de animais vivos, nem de tecidos animais, para a determinação da corrosividade cutânea.

A determinação da corrosividade cutânea tem normalmente feito uso de animais de laboratório (2). A preocupação com a dor e o sofrimento inerentes a esse processo levou à revisão do método de ensaio B.4, tendo passado a ser possível determinar a corrosão da pele por métodos alternativos (*in vitro*), que evitam a dor e o sofrimento de animais.

A primeira etapa com vista à definição de ensaios alternativos que pudessem ser utilizados na determinação da corrosividade cutânea num contexto legislativo foi a realização de estudos de pré-validação (3). Seguidamente, foi realizado um estudo com vista à validação formal de métodos *in vitro* para a determinação da corrosão da pele (4) (5) (6) (7) (8). O resultado desses estudos e outra literatura publicada (9) conduziram à recomendação de que poderiam ser utilizados para determinar a corrosividade cutânea *in vivo* (10) (11) (12) (13) o ensaio em modelos de pele humana (o presente método) e o ensaio da resistência eléctrica transcutânea (ver o método de ensaio B.40).

Os estudos de validação concluíram que os ensaios em modelos de pele humana (3) (4) (5) (9) permitem distinguir com fiabilidade as substâncias reconhecidamente corrosivas da pele das que o não são. O protocolo de ensaio pode estabelecer igualmente uma primeira distinção entre substâncias muito corrosivas e menos corrosivas da pele.

O ensaio descrito no presente método permite identificar misturas e substâncias químicas corrosivas. Permite igualmente identificar misturas e substâncias químicas não corrosivas, quando associado a outras informações disponíveis (por exemplo, pH, relações estrutura-actividade, dados humanos ou em animais) que corroborem tais características (1) (2) (13) (14). O método não permite normalmente obter informações adequadas sobre a irritação da pele, nem permite dividir as substâncias corrosivas em categorias (como as previstas no sistema de classificação harmonizado global) (1).

Para uma avaliação completa dos efeitos locais na pele após uma exposição única por via dérmica recomenda-se a aplicação da estratégia de ensaio sequencial apensa ao método de ensaio B.4 (2) e associada ao sistema harmonizado global (1). Essa estratégia de ensaio inclui a realização de ensaios de corrosão da pele (descritos no presente método) e de irritação da pele *in vitro* antes de ser ponderada a realização de ensaios em animais vivos.

▼B

1.2. DEFINIÇÕES

Corrosão da pele *in vivo*: Produção de danos irreversíveis à pele, nomeadamente a necrose visível da epiderme, prolongando-se para a derme, após a aplicação de uma substância em estudo durante um máximo de quatro horas. São exemplos típicos de reacções corrosivas as úlceras, hemorragias e escaras sanguinolentas e, para o final do período de observação de 14 dias, a descoloração, devido à perda de pigmentação da pele, a formação de zonas de alopecia total e a ocorrência de cicatrizes. As lesões duvidosas poderão ser esclarecidas por métodos histopatológicos.

Viabilidade celular: Parâmetro que mede a actividade total de uma população celular (por exemplo, capacidade das desidrogenases mitocondriais celulares de reduzirem o pigmento vital MTT); consoante o parâmetro determinado e o tipo de ensaio realizado, é possível correlacionar a viabilidade celular com o número total e/ou a vitalidade das células.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Quadro 1

Substâncias químicas de referência

Denominação	Número EINECS	Número CAS	
1,2-Diaminopropano	201-155-9	78-90-0	Extremamente corrosivo
Ácido acrílico	201-177-9	79-10-7	Extremamente corrosivo
2-terc-Butilfenol	201-807-2	88-18-6	Corrosivo
Hidróxido de potássio (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Corrosivo
Ácido sulfúrico (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Corrosivo
Ácido octanóico (ácido caprílico)	204-677-5	124-07-02	Corrosivo
4-Amino-1,2,4-triazole	209-533-5	584-13-4	Não corrosivo
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Não corrosivo
Brometo de fenetilo	203-130-8	103-63-9	Não corrosivo
Tetracloroetileno	204-825-9	27-18-4	Não corrosivo
Ácido isoesteárico	250-178-0	30399-84-9	Não corrosivo
4-(Metiltio)-benzaldeído	222-365-7	3446-89-7	Não corrosivo

A maioria das substâncias químicas constantes do quadro foi retomada da lista seleccionada para o estudo de validação internacional do ECVAM (4). A selecção baseia-se nos seguintes critérios:

i) Número idêntico de substâncias corrosivas e não corrosivas;

ii) Substâncias disponíveis no comércio e da maioria das classes químicas pertinentes;

iii) Inclusão de substâncias extremamente corrosivas e de substâncias menos corrosivas, para possibilitar uma diferenciação com base no poder corrosivo;

▼B

iv) Escolha de substâncias químicas que podem ser manuseadas no laboratório sem outros perigos graves além da corrosividade.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A matéria em estudo é aplicada localmente num modelo tridimensional de pele humana que inclua, pelo menos, uma epiderme reconstruída, com um *stratum corneum* funcional. As matérias corrosivas são identificadas pela sua capacidade de diminuição da viabilidade celular [determinada, por exemplo, pelo ensaio de redução do MTT (15)] para valores inferiores a limites definidos após períodos de exposição especificados. O princípio do ensaio em modelos de pele humana baseia-se na hipótese de as substâncias químicas corrosivas conseguirem penetrar o *stratum corneum* por difusão ou erosão, revelando-se citotóxicas para as camadas celulares subjacentes.

1.4.1. **Método**

1.4.1.1. *Modelos de pele humana*

Os modelos de pele humana podem ser construídos ou obtidos comercialmente (por exemplo, os modelos EpiDerm™ e EPISKIN™) (16) (17) (18) (19) ou ser desenvolvidos ou construídos no laboratório de ensaio (20) (21). É sabido que a utilização de pele humana está sujeita a condições e considerações nacionais e internacionais de natureza ética. Os novos modelos devem ser sempre validados (pelo menos na perspectiva descrita no ponto 1.4.1.1.2). Os modelos de pele humana utilizados no presente ensaio devem respeitar obrigatoriamente as seguintes condições:

1.4.1.1.1. Condições gerais do modelo

Na construção do epitélio devem ser utilizados queratinócitos humanos. Devem estar presentes múltiplas camadas de células epiteliais viáveis, sob um *stratum corneum* funcional. O modelo cutâneo também pode compreender uma camada estromática. O *stratum corneum* deve ter múltiplas camadas com o perfil lipídico necessário para produzir uma barreira funcional suficientemente robusta para resistir a uma penetração rápida de marcadores citotóxicos. As propriedades de contenção do modelo devem impedir a passagem de matéria para o tecido viável por contorno do *stratum corneum*. O contorno do *stratum corneum* pelas substâncias químicas em estudo redundaria numa modelização deficiente da exposição cutânea. O modelo cutâneo não deve estar contaminado por bactérias (incluindo micoplasmas) ou fungos.

1.4.1.1.2. Condições funcionais do modelo

O grau de viabilidade é normalmente quantificado utilizando MTT ou outros corantes vitais convertidos por via metabólica. Nesses casos, a densidade óptica do corante (solubilizado) extraído da amostra de controlo negativa de tecido deve ser, pelo menos, vinte vezes maior do que a densidade óptica do solvente de extracção isoladamente [ver mais pormenores em (22)]. A amostra de controlo negativa de tecido deve ser estável em cultura (deve permitir obter medições de viabilidade similares) durante o período de exposição do ensaio. O *stratum corneum* deve ser suficientemente robusto para resistir à penetração rápida de determinadas substâncias químicas marcadoras citotóxicas (por exemplo, o Triton X-10 a 1 %). Esta propriedade pode ser estimada através do tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade celular em 50 % (TE50) (no caso dos modelos EpiDerm e EPISKIN, por exemplo, esse tempo é superior a 2 horas). O tecido deve ser reprodutível ao longo do tempo e, de preferência, de laboratório para laboratório. Deve, além disso, permitir prever o poder corrosivo das substâncias químicas de referência (ver o quadro 1), quando utilizado no protocolo de ensaio seleccionado.

▼B

1.4.1.2. *Aplicação das substâncias em estudo e de controlo*

Em cada tratamento (tempo de exposição), incluindo no caso das amostras de controlo, é utilizado um duplicado de tecido. No caso das matérias líquidas, aplica-se uma quantidade de substância em estudo suficiente para cobrir uniformemente toda a superfície de pele (no mínimo 25 µl/cm^2). No caso das matérias sólidas, aplica-se uniformemente uma quantidade de substância em estudo suficiente para cobrir toda a pele, sendo a mesma depois humidificada, com água desionizada ou destilada, para garantir um bom contacto com a pele. Se necessário, os sólidos serão reduzidos por moagem a uma forma pulverulenta antes da aplicação. O método de aplicação deve ser adequado à substância em estudo [ver, por exemplo, (5)]. Após o período de exposição, a matéria em estudo deve ser cuidadosamente removida da superfície da pele, por lavagem com uma solução-tampão adequada ou NaCl a 0,9 %.

Para garantir a adequabilidade do modelo experimental, devem utilizar-se em paralelo, em cada estudo, uma amostra de controlo positiva e uma amostra de controlo negativa. As substâncias sugeridas para as amostras de controlo positivas são o ácido acético glacial ou KOH 8N. Para as amostras de controlo negativas são sugeridos NaCl a 0,9 % ou água.

1.4.1.3. *Medição da viabilidade celular*

Na medição da viabilidade celular só poderão utilizar-se métodos quantitativos validados. O tipo de medição de viabilidade deve, além disso, poder ser utilizado num tecido de construção tridimensional. Não deve haver interferências de ligações inespecíficas de corantes na medição de viabilidade. Os corantes que se liguem a proteínas e os que não sofram conversão metabólica (por exemplo, o vermelho neutro) não são, portanto, adequados. O ensaio mais frequentemente utilizado é o da redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolil; n.º EINECS 206-069-5; n.º CAS 298-93-1), que se demonstrou permitir obter resultados rigorosos e reprodutíveis (5), embora possam ser utilizados outros. Coloca-se a amostra de pele numa solução de MTT de concentração apropriada (por exemplo, 0,3-1 mg/ml), a uma temperatura de incubação adequada, durante 3 horas. O precipitado azul do derivado formazan é depois extraído com um solvente (isopropanol), medindo-se a concentração do formazan por determinação da densidade óptica a um comprimento de onda compreendido entre 540 nm e 595 nm.

A acção química da matéria em estudo no corante vital pode assemelhar-se à do metabolismo celular, daí resultando uma estimativa falsa de viabilidade. Demonstrou-se a ocorrência deste fenómeno quando uma matéria em estudo com tais características não fora completamente removida da pele por lavagem (9). Se a matéria em estudo agir directamente sobre o corante vital, será necessário utilizar amostras de controlo suplementares para detectar e corrigir a interferência das substâncias em estudo na medição da viabilidade (9)(23).

2. **RESULTADOS**

Para cada tecido, os valores de densidade óptica e as percentagens calculadas de viabilidade celular correspondentes à matéria em estudo e às amostras de controlo positiva e negativa devem ser apresentados num quadro recapitulativo, incluindo os resultados dos replicados ou repetições, consoante o caso, e os valores individuais e médios.

▼B

2.1. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os valores de densidade óptica obtidos para cada amostra em estudo podem ser utilizados para calcular uma percentagem de viabilidade em relação à amostra de controlo negativa (que é arbitrariamente fixada em 100 %). A percentagem de viabilidade celular que estabelece a diferenciação entre as matérias em estudo corrosivas e não corrosivas (ou entre diferentes classes de corrosividade) ou o(s) método(s) estatístico(s) utilizado(s) para avaliar os resultados e identificar as matérias corrosivas devem ser claramente definidos e documentados e deve ser demonstrado que são adequados. Em geral, esses valores-limite de diferenciação são estabelecidos durante a optimização dos ensaios, testados durante uma fase de pré-validação e confirmados num estudo de validação. A título de exemplo, a previsão de corrosividade associada ao modelo EpiDerm™ é a seguinte (9):

A substância em estudo será considerada corrosiva da pele:

i) Se a viabilidade após uma exposição de 3 minutos for inferior a 50 %; ou

ii) Se a viabilidade após uma exposição de 3 minutos for igual ou superior a 50 % e a viabilidade após uma exposição de 1 hora for inferior a 15 %.

A substância em estudo será considerada não corrosiva da pele:

i) Se a viabilidade após uma exposição de 3 minutos for igual ou superior a 50 % e a viabilidade após uma exposição de 1 hora for igual ou superior a 15 %.

3. **RELATÓRIOS**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Substância em estudo e de controlo:

— Denominação ou denominações químicas (como as denominações IUPAC ou CAS e o n.º CAS, se forem conhecidos);

— Grau de pureza e composição da substância ou preparação (em percentagem ponderal);

— Propriedades físico-químicas (estado físico, pH, estabilidade, hidrossolubilidade) relevantes para o estudo;

— Tratamento das substâncias em estudo/de controlo antes do ensaio, se for o caso (por exemplo, aquecimento, moagem);

— Estabilidade, se for conhecida.

Justificação do modelo cutâneo e do protocolo utilizados.

Condições de ensaio:

— Sistema celular utilizado;

— Informações sobre a calibração do equipamento de medição utilizado para medir a viabilidade celular (por exemplo, espectrofotómetro);

▼B

— Informações completas que substanciem o modelo cutâneo específico utilizado, incluindo sobre a validade do mesmo;

— Pormenores sobre o método de ensaio utilizado;

— Doses de ensaio utilizadas;

— Descrição de eventuais modificações do método de ensaio;

— Referência a dados anteriormente publicados sobre o modelo;

— Descrição dos critérios de avaliação utilizados.

Resultados:

— Quadro recapitulativo dos resultados correspondentes a cada amostra de ensaio;

— Descrição de outros efeitos eventualmente observados.

Discussão dos resultados.

Conclusão.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

(2) Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/Corrosion.

(3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M., (1995) A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23, p. 219-255.

(4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P., (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxicology *In Vitro* 12, p. 471-482.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M., (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, p. 483-524.

(6) OECD, (1996) Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, p. 62.

(7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F., (1995) Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, p. 129-147.

(8) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)., (1997) Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

▼B

(9) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G., (2000) The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, p. 371-401.

(10) ECVAM, (1998) ECVAM News & Views. ATLA 26, p. 275-280.

(11) ECVAM, (2000) ECVAM News & Views. ATLA 28, p. 365-67.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), (2002) ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

(13) OCDE (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st - 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

(14) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M., (1998) An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, p. 709-720.

(15) Mosmann, T., (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity asssays. J.Immunol. Meth. 65, p. 55-63.

(16) Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxicology *In Vitro* 8, p. 889-891.

(17) Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterisation of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics 203, p. 211-225.

(18) Tinois, E., Gaetani, Q., Gayraud, B., Dupont, D., Rougier, A., Pouradier, D.X., (1994) The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In *In vitro* Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach, p. 133-140

(19) Tinois, E., Tiollier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M., Thivolet, J., (1991) *In vitro* and post –transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193, p. 310-319

(20) Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H., (1992) The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, p. 163-171.

(21) Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L., (1994) Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, p. 747-756.

▼B

(22) Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J., (1995) A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, p. 69-84.

(23) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne', C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A., (2001) A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 15, p. 57-93.

▼B

B.41. ENSAIO DE FOTOTOXICIDADE *IN VITRO* 3T3 NRU

1. MÉTODO

Este método é equivalente ao OECD TG 432 (2004).

1.1. INTRODUÇÃO

A fototoxicidade é definida como uma reacção tóxica a uma substância aplicada ao corpo que é desencadeada ou intensificada (quando já se manifeste a doses inferiores) pela exposição subsequente à luz, ou induzida pela irradiação da pele depois da administração sistémica da substância.

O ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU é utilizado para definir o potencial fototóxico de uma substância em estudo, induzido pela substância química excitada por exposição à luz. O ensaio avalia a fototoxicidade através da redução relativa da viabilidade de células expostas à substância química na presença de luz, comparativamente à obscuridade. As substâncias que respondam a este ensaio serão provavelmente fototóxicas *in vivo*, após aplicação sistémica e difusão pela pele ou após aplicação tópica.

Têm sido referidos os efeitos fototóxicos induzidos por muitos tipos de substâncias químicas (1) (2) (3) (4). A característica comum dessas substâncias é a capacidade de absorverem energia luminosa da radiação solar. De acordo com a primeira lei da fotoquímica (lei de Grotthaus-Draper), é necessária a absorção de uma quantidade suficiente de quanta de luz para que se observe uma fotorreacção. Antes de ser ponderada a realização de ensaios biológicos é, portanto, necessário determinar, pelo método OECD TG 101, o espectro de absorção no UV/visível da substância química em estudo. Tem sido referido que, se o coeficiente de absorção/extinção molar for inferior a 10 $l.mol^{-1}$ $.cm^{-1}$, a substância química não será provavelmente fotorreactiva. Uma substância química com tais características poderá não necessitar de ser submetida ao ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU ou a qualquer outro ensaio biológico para a determinação de efeitos fotoquímicos adversos (1) (5). Ver igualmente o anexo 1.

A fiabilidade e pertinência do ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU foram recentemente avaliadas (6) (7) (8) (9). O ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU revelou-se capaz de prever efeitos fototóxicos agudos em animais e pessoas *in vivo.* O ensaio não se destina a prever outros efeitos adversos que possam resultar da acção combinada de uma substância química e da luz — não trata, por exemplo, da fotogenotoxicidade, da fotoalergia ou da fotocareinogenicidade —, nem permite determinar o poder fototóxico. O ensaio também não cobre mecanismos indirectos de fototoxicidade, efeitos de metabolitos das substâncias em estudo ou efeitos de misturas.

Embora, de modo geral, seja necessário recorrer a sistemas de activação metabólica em todos os ensaios *in vitro* de previsão de potenciais genotóxicos ou carcinogénicos, no domínio da fototoxicologia são ainda raros os exemplos de substâncias químicas que necessitem de transformação metabólica para agirem como fototoxina *in vivo* ou *in vitro.* Não é, portanto, considerado necessário, nem cientificamente justificado, utilizar um sistema de activação metabólica no presente ensaio.

▼B

1.2. DEFINIÇÕES

Irradiância: Intensidade da radiação ultravioleta (UV) ou da luz visível que incide numa superfície, expressa em W/m^2 ou mW/cm^2.

Dose de radiação: Quantidade (= intensidade x tempo) de radiação ultravioleta (UV) ou de luz visível que incide numa superfície, expressa em joules (= W x s) por unidade de superfície (por exemplo, J/m ou J/cm^2).

Bandas de comprimento de onda de radiação UV: As designações recomendadas pela CIE (*Commission Internationale de l'Éclairage*) são: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (100--280 nm). Também se utilizam outras designações: a separação entre os UVB e os UVA é frequentemente situada a 320 nm, podendo as radiações UVA subdividir-se em UV-A1 e UV-A2, com a separação a cerca de 340 nm.

Viabilidade celular: Parâmetro que mede a actividade total de uma população celular (por exemplo, absorção do pigmento vital vermelho neutro pelos lisossomas celulares); consoante a variável determinada e o tipo de ensaio realizado, é possível correlacionar a viabilidade celular com o número total e/ou a vitalidade das células.

Viabilidade celular relativa: Viabilidade celular expressa em relação a amostras de controlo (negativas) constituídas pelo solvente e submetidas a todo o procedimento de ensaio (+ Irr ou - Irr), excluído o tratamento com a substância em estudo.

PIF *(photo irritation factor* — factor de fotoirritação): Factor obtido por comparação entre duas concentrações citotóxicas igualmente eficazes (CI50) da substância química em estudo, respectivamente sem (- Irr) e com (+ Irr) exposição a uma dose não citotóxica de radiação UVA/luz visível.

CI_{50}: Concentração da substância química em estudo que reduz a viabilidade celular em 50 %.

MPE (*mean photo effect* — fotoefeito médio): Parâmetro obtido por tratamento matemático das duas curvas de concentração obtidas sem (- Irr) e com (+ Irr) exposição a uma dose não citotóxica de radiação UVA/luz visível.

Fototoxicidade: Reacção tóxica aguda desencadeada pela primeira exposição da pele a determinadas substâncias químicas, seguida de exposição à luz, ou analogamente induzida por irradiação da pele depois da administração sistémica da substância.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU baseia-se na comparação da citotoxicidade de uma substância química com ou sem exposição a uma dose não citotóxica de luz solar simulada. No âmbito deste ensaio, a citotoxicidade é expressa pela redução, função da concentração, da absorção do pigmento vital vermelho neutro, medida 24 horas depois do tratamento com a substância química em estudo e da irradiação (10). O vermelho neutro (Neutral Red, NR) é um corante catiónico fraco que penetra facilmente nas membranas celulares por um mecanismo distinto da difusão, acumulando-se nos lisossomas intracelulares. As alterações da superfície da sensível membrana dos lisossomas fragilizam estes últimos e originam outras alterações, que se tornam gradualmente irreversíveis. Essas alterações resultantes da acção dos xenobióticos reduzem a absorção e ligação do vermelho neutro. Pode, portanto, estabelecer-se uma distinção entre células viáveis, danificadas ou mortas, base do presente ensaio.

▼B

Efectua-se uma cultura de células Balb/c 3T3 durante 24 h, para formação de monocamadas. Para cada substância química em estudo, procede-se à pré-incubação, durante 1 h, de duas placas de 96 alvéolos com oito concentrações diferentes da substância. A seguir, expõe-se uma das placas à mais elevada dose de irradiação não citotóxica e mantém-se a outra na obscuridade. Seguidamente, substitui-se o meio de tratamento por meio de cultura em ambas as placas; após nova incubação de 24 horas, determina-se a viabilidade celular através da absorção do vermelho neutro. A viabilidade celular é expressa em percentagem das amostras de solvente não tratadas de controlo e é calculada para cada concentração de ensaio. Para a previsão do potencial fototóxico, comparam-se as reacções, função da concentração, obtidas com e sem irradiação, em geral ao nível CI_{50} (concentração que reduz a viabilidade celular a 50 %, relativamente às amostras de controlo não tratadas).

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Preparações**

1.4.1.1. *Células*

No estudo de validação, foi utilizada uma linhagem celular permanente de fibroblastos de ratinho (Balb/c 3T3, clone 31) proveniente da ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, EUA) ou da ECACC (*European Collection of Cell Cultures*, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), a qual é, portanto, recomendada, devendo ser obtida de uma colecção de células adequadamente qualificada. Podem utilizar-se outras células ou linhagens celulares, aplicando o mesmo procedimento de ensaio, se as condições de cultura forem adaptadas às necessidades específicas das células em causa, embora deva, nesse caso, ser demonstrada a equivalência.

Deve comprovar-se regularmente que as células não estão contaminadas por micoplasmas, só devendo as mesmas ser utilizadas se esse tipo de microrganismo não for detectado (11).

É importante comprovar periodicamente a sensibilidade das células às radiações UV por aplicação do procedimento de controlo de qualidade descrito no presente método. Uma vez que a sensibilidade das células às radiações UVA pode aumentar com o número de repicagens, devem utilizar-se células Balb/c 3T3 que tenham sido objecto do menor número possível de repicagens (de preferência menos de 100). (Ver o ponto 1.4.2.2.2 e o anexo 2.)

1.4.1.2. *Meios e condições de cultura*

Nas repicagens celulares de rotina e na execução do ensaio, devem utilizar-se meios de cultura e condições de incubação adequados; por exemplo, no caso das células Balb/c 3T3, recomenda-se a utilização de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), enriquecido com soro de bovino recém-nascido (10 %), glutamina (4 mM), penicilina (100 UI) e estreptomicina (100 µg/ml), e a incubação em atmosfera húmida a 37ºC, com 5 % a 7,5 % de CO_2, dependendo do tampão (ver o segundo parágrafo do ponto 1.4.1.4). É particularmente importante que as condições de cultura celular permitam manter o ciclo celular dentro dos valores normais publicados das células ou linhagem celular utilizadas.

1.4.1.3. *Preparação das culturas*

Inoculam-se num meio de cultura com a densidade adequada células provenientes de culturas-mãe congeladas, efectuando-se pelo menos uma subcultura antes de as utilizar no ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU.

▼B

Para o ensaio de fototoxicidade, inoculam-se as células num meio de cultura com a densidade apropriada, de modo que as culturas não confluam durante o ensaio, ou seja, até à determinação da viabilidade celular, 48 h após a inoculação das células. No caso das células Balb/c 3T3 cultivadas em placas de 96 alvéolos, recomenda-se uma densidade de inoculação de 1 x 10 células por alvéolo.

Para cada substância química em estudo, inoculam-se as células de modo idêntico em duas placas de 96 alvéolos, mantendo-se depois as condições de cultura de ambas ao longo de todo o ensaio, excepto durante o período de irradiação de uma das placas (+ Irr), durante o qual a outra é mantida na obscuridade (- Irr).

1.4.1.4. *Preparação da substância em estudo*

As substâncias em estudo devem preparar-se de fresco, imediatamente antes da utilização, excepto se se mantiverem comprovadamente estáveis na armazenagem. Recomenda-se que a manipulação da substância química e o tratamento inicial das células decorram sob condições de luz que evitem a fotoactivação ou degradação da substância em estudo antes da irradiação.

Dissolvem-se as substâncias em estudo em tampões salinos, como o EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*) ou outra solução-tampão fisiologicamente equilibrada, isentos de componentes proteicos e de componentes que absorvam a luz (por exemplo, corantes indicadores de pH ou vitaminas), para evitar interferências durante a irradiação. Dado que, durante a irradiação, as células são mantidas cerca de 50 minutos fora do incubador sob atmosfera de CO_2, é necessário tomar precauções para evitar a alcalinização. Se forem utilizados tampões fracos, como o EBSS, poderão, para o efeito, incubar-se as células sob uma atmosfera com 7,5 % de CO_2. Se as células forem incubadas sob uma atmosfera com apenas 5 % de CO_2, será necessário utilizar um tampão mais forte.

As substâncias químicas em estudo fracamente solúveis em água devem ser dissolvidas num solvente adequado. Caso se utilize um solvente, a sua concentração volúmica deve ser constante em todas as culturas, tanto nas amostras de controlo negativas (solvente) como a todas as concentrações da substância química em estudo, e o solvente não deve ser citotóxico àquela concentração. As concentrações da substância química em estudo devem ser escolhidas de modo a evitar precipitados ou turvações.

Recomenda-se a utilização de dimetilsulfóxido (DMSO) e de etanol como solventes. Podem utilizar-se outros solventes de baixa citotoxicidade. Antes de serem utilizados, devem, porém, avaliar-se determinadas propriedades específicas, nomeadamente a reactividade com a substância química em estudo, a atenuação do efeito fototóxico, propriedades de eliminação de radicais e/ou a estabilidade química no solvente.

Se necessário, pode recorrer-se a um agitador mecânico e/ou a ultra-sons e/ou a aquecimento a temperaturas apropriadas para facilitar a dissolução, salvo se tal afectar a estabilidade da substância química em estudo.

▼B

1.4.1.5. *Condições de irradiação*

1.4.1.5.1. Fonte luminosa

A escolha de uma fonte luminosa e de filtros adequados é crucial nos ensaios de fototoxicidade. As regiões do visível e do UVA encontram-se normalmente associadas a reacções fototóxicas *in vivo* (3) (12), ao passo que os UVB são, em geral, menos importantes a esse nível, apresentando em contrapartida elevada citotoxicidade; esta aumenta de um factor de 1 000 ao passar de um comprimento de onda de 313 nm para 280 nm (13). Os critérios de selecção de uma fonte luminosa adequada devem incluir os requisitos da emissão de comprimentos de onda que a substância química em estudo absorva (espectro de absorção) e da obtenção, num período de exposição razoável, de doses de luz suficientes para a detecção das substâncias químicas fotocitotóxicas conhecidas. Além disso, os comprimentos de onda e as doses utilizadas não devem causar danos desnecessários ao sistema em estudo, nomeadamente devido à emissão de calor (região do infravermelho).

Considera-se que a melhor fonte luminosa artificial é constituída por simuladores de luz solar. A distribuição da potência de irradiação do simulador de luz solar com filtros deve ser próxima da correspondente à luz solar ao ar livre descrita em (14). Como simuladores de luz solar são utilizados arcos de xénon e arcos de mercúrio (dopado)--halogeneto metálico (15). Estes últimos apresentam a vantagem de emitirem menos calor e de serem mais económicos, mas não reproduzem a luz solar tão bem como os arcos de xénon. Dado que todos os simuladores de luz solar emitem quantidades significativas de radiação UVB, devem utilizar-se filtros adequados para atenuar os comprimentos de onda UVB, altamente citotóxicos. Dado que o material de plástico utilizado nas culturas celulares contém estabilizadores de UV, o espectro deve ser medido através do mesmo tipo de cobertura das placas de 96 alvéolos utilizado no ensaio. Independentemente das medidas tomadas para atenuar partes do espectro com filtros e dos efeitos de filtro inevitáveis do equipamento, o espectro registado após os filtros utilizados não deve desviar-se do espectro normalizado da luz solar ao ar livre (14). As referências (8) e (16) contêm um exemplo da distribuição espectral da irradiância do simulador de luz solar com filtros utilizado no estudo de validação do ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU. Ver igualmente a figura 1 do anexo 2.

1.4.1.5.2. Dosimetria

Regularmente, antes de cada ensaio de fototoxicidade, deve comprovar-se a intensidade luminosa (irradiância) com um medidor de UV de banda larga adequado. A intensidade deve ser medida através do mesmo tipo de cobertura das placas de 96 alvéolos utilizado no ensaio. O medidor de UV deve ter sido previamente calibrado para a fonte luminosa. Deve comprovar-se o desempenho do medidor de UV, recomendando-se para tal a utilização de um segundo medidor de UV de referência do mesmo tipo, calibrado do mesmo modo. O ideal seria utilizar, mais espaçadamente, um espectrorradiómetro para medir o espectro de irradiação da fonte luminosa filtrada e comprovar a calibração do medidor de UV de banda larga.

Verificou-se que uma dose de 5 J/cm^2 (medida na região UVA) não é citotóxica para as células Balb/c 3T3 e é suficientemente potente para excitar as substâncias químicas, desencadeando reacções fototóxicas (6)(17); por exemplo, para obter 5 J/cm^2 em 50 minutos, ajustou-se a irradiância a 1,7 mW/cm^2. Ver igualmente a figura 2 do anexo 2. Caso se utilize outra linhagem celular ou outra fonte luminosa, pode ser necessário regular a dose irradiante, seleccionando-a de modo a que seja suficiente para excitar as fototoxinas de referência sem danificar as células. A duração da exposição luminosa é calculada do seguinte modo:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dose de irradiação } (J/cm^2) \times 1000}{\text{irradiância } (mW/cm^2) \times 60} \qquad (1\ J = 1\ W.s)$$

1.4.2. **Condições de ensaio**

1.4.2.1. *Concentrações da substância em estudo*

As gamas de concentração da substância química em estudo com (+ Irr) e sem (- Irr) irradiação devem ser determinadas de forma adequada, em ensaios de determinação da gama de concentrações. Pode ser útil determinar a solubilidade de início e aos 60 minutos (ou após um período correspondente ao tempo de tratamento a utilizar), pois esse parâmetro pode variar ao longo do tempo ou durante a exposição. Para evitar efeitos tóxicos induzidos por condições de cultura inadequadas ou por substâncias químicas muito ácidas ou muito alcalinas, o pH das culturas celulares com a substância química em estudo deve situar-se entre 6,5 e 7,8.

A concentração mais elevada da substância química em estudo deve situar-se na gama de condições fisiológicas de ensaio; devem, nomeadamente, ser evitadas situações de tensão osmótica ou de pH. Consoante a substância química em estudo, pode ser necessário ter em conta outras propriedades físico-químicas como factor limitante da concentração de ensaio mais elevada. No caso das substâncias relativamente insolúveis que não sejam tóxicas a concentrações até ao ponto de saturação, deve ser ensaiada a concentração máxima possível. Em geral, deve ser evitada a precipitação da substância química em estudo a qualquer concentração de ensaio. A concentração máxima de uma substância em estudo não deve exceder 1 000 μg/ml; a osmolaridade não deve exceder 10 mmolar. Deve ser utilizada uma série geométrica de diluições constituída por oito concentrações da substância em estudo, com um factor de diluição constante (ver segundo parágrafo do ponto 2.1).

Se existirem dados (obtidos num ensaio de determinação da gama de concentrações) que revelem que a substância química em estudo não é citotóxica até à concentração-limite no ensaio sem irradiação (- Irr), mas é fortemente citotóxica quando irradiada (+ Irr), a gama de concentrações a seleccionar para o ensaio com irradiação (+ Irr) pode diferir da gama de concentrações seleccionada para o ensaio sem irradiação, para satisfazer os requisitos de adequabilidade da qualidade dos dados.

1.4.2.2. *Amostras de controlo*

1.4.2.2.1. Sensibilidade celular à radiação, estabelecimento de dados de referência

A sensibilidade das células à fonte luminosa deve ser verificada regularmente (aproximadamente todas as cinco repicagens) determinando a viabilidade celular após exposição a doses crescentes de irradiação. Nessa determinação, devem ser utilizadas várias doses de irradiação, incluindo níveis substancialmente superiores aos utilizados no ensaio de fototoxicidade 3T3 NRU. Essas doses são mais facilmente quantificadas através de medições na região do ultravioleta da fonte luminosa. A densidade de inoculação das células deve ser idêntica à que será irradiada no dia seguinte no ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU. A viabilidade celular é determinada no dia imediato com base na absorção do vermelho neutro. Deve ser demonstrado que a dose não citotóxica mais elevada resultante [5 J/cm^2 (UVA) no estudo de validação, por exemplo] se revelou suficiente para classificar correctamente as substâncias químicas de referência (quadro 1).

▼B

1.4.2.2.2. Sensibilidade à radiação no ensaio em curso

O ensaio satisfaz os critérios de qualidade se as amostras de controlo negativas (solvente) irradiadas revelarem uma taxa de viabilidade superior a 80 %, comparativamente à amostra de controlo negativa (solvente) não irradiada.

1.4.2.2.3. Viabilidade associada às amostras de controlo constituídas pelo solvente

A densidade óptica absoluta ($DO_{540\ NRU}$) do vermelho neutro extraído das amostras de controlo constituídas pelo solvente indica se as $1x10^4$ células inoculadas em cada alvéolo se reproduziram com um tempo de duplicação normal durante os dois dias do ensaio. Um ensaio satisfaz os critérios de aceitação se a $DO_{540\ NRU}$ média das amostras de controlo não tratadas for > 0,4 (ou seja, cerca de vinte vezes a absorvância de fundo do solvente).

1.4.2.2.4. Amostras de controlo positivas

Paralelamente a cada ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU deve efectuar-se um ensaio com uma substância química fototóxica conhecida. Recomenda-se a clorpromazina (CPZ). Foram definidos os seguintes critérios de aceitação do ensaio para a utilização de clorpromazina de acordo com o protocolo normalizado do ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU: CPZ irradiada (+ Irr), CI_{50} = 0,1 a 2,0 μg/ml; CPZ não irradiada (- Irr), CI_{50} = 7,0 a 90,0 μg/ml. O factor de fotoirritação (PIF) deve ser superior a 6. Os resultados obtidos para as amostras de controlo positivas devem ser acompanhados ao longo do tempo.

Em vez da clorpromazina podem utilizar-se nas amostras de controlo positivas submetidas em paralelo ao ensaio outras substâncias químicas fototóxicas adequadas à categoria química ou às características de solubilidade da substância química em estudo.

1.4.3. **Procedimento de ensaio (6) (7) (8) (16) (17)**

1.4.3.1. *Primeiro dia*

Introduzir 100 μl de meio de cultura nos alvéolos periféricos de uma placa de microtitulação com 96 alvéolos para a cultura de tecidos (brancos). Nos restantes alvéolos, introduzir 100 μl de uma suspensão celular de 1×10^5 células/ml em meio de cultura (1×10^4 células por alvéolo). Devem ser preparadas duas placas para cada série de concentrações da substância em estudo e as amostras de controlo constituídas pelo solvente e positivas.

Incubar as células durante 24 h (ver o ponto 1.4.1.2), até à formação de uma monocamada semiconfluente. Este período de incubação permite a recuperação, a aderência e o crescimento exponencial das células.

1.4.3.2. *Segundo dia*

Após a incubação, decantar o meio de cultura das células e lavar cuidadosamente com 150 μl da solução tamponada utilizada na incubação. Adicionar 100 μl de tampão, com a concentração adequada da substância química em estudo ou do solvente (amostra de controlo constituída pelo solvente). Constituir oito concentrações diferentes da substância química em estudo. Incubar as células com a substância química em estudo, na obscuridade, durante 60 minutos (ver o ponto 1.4.1.2 e o segundo parágrafo do ponto 1.4.1.4).

Das duas placas preparadas para cada série de concentrações da substância química em estudo e amostras de controlo, uma é seleccionada, em geral de forma aleatória, para a determinação da citotoxicidade (- Irr), constituindo a placa de controlo, e a outra (a placa de tratamento) para a determinação da fototoxicidade (+ Irr).

▼B

No ensaio + Irr irradiam-se as células durante 50 minutos, à temperatura ambiente, através da cobertura da placa de 96 alvéolos, com a dose mais elevada de radiação não citotóxica (ver também o anexo 2). Manter as placas não irradiadas (- Irr) na obscuridade, à temperatura ambiente, durante 50 minutos (período idêntico ao da exposição luminosa).

Decantar a solução de ensaio e lavar cuidadosamente duas vezes com 150 µl da solução tamponada utilizada na incubação, mas sem a matéria em estudo. Substituir o tampão por meio de cultura e incubar (ver o ponto 1.4.1.2) de um dia para o outro (18 h a 22 h).

1.4.3.3. *Terceiro dia*

1.4.3.3.1. Exame microscópico

Utilizando um microscópio de contraste de fase examinam-se o crescimento e a morfologia das células e a integridade da monocamada celular. Registar as alterações morfológicas das células e os efeitos ao nível do crescimento celular.

1.4.3.3.2. Ensaio de absorção do vermelho neutro

Lavar as células com 150 µl de tampão pré-aquecido. Remover a solução de lavagem batendo levemente. Adicionar 100 µl de vermelho neutro (NR, cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina, número EINECS 209-035-8, número CAS 553-24-2; C.I. 50040) com a concentração de 50 µg/ml em meio sem soro (16) e incubar conforme descrito no ponto 1.4.1.2 durante 3 horas. Depois da incubação, remover o meio com vermelho neutro e lavar as células com 150 µl de tampão. Decantar e remover o excesso de tampão por uma técnica de *blotting* ou por centrifugação.

Adicionar exactamente 150 µl de solução de dessorção do vermelho neutro (solução preparada de fresco constituída por 49 partes de água, 50 partes de etanol e uma parte de ácido acético).

Agitar cuidadosamente a placa de microtitulação num agitador próprio para esse tipo de placas, durante 10 minutos, até ao vermelho neutro ser extraído das células e formar uma solução homogénea.

Medir a densidade óptica do extracto de vermelho neutro a 540 nm num espectrofotómetro, utilizando os brancos como referência. Armazenar os resultados num ficheiro electrónico de formato adequado, para tratamento posterior.

2. RESULTADOS

2.1. QUALIDADE E QUANTIDADE DOS RESULTADOS

Os resultados do ensaio devem permitir uma análise significativa da resposta obtida às variações de concentração com e sem irradiação, bem como, se possível, da concentração da substância química em estudo que reduz a viabilidade celular a 50 % (CI_{50}). Caso se observe citotoxicidade, a gama de concentrações e o intervalo entre as concentrações devem ser fixados de modo a possibilitar a adaptação de uma curva aos dados experimentais.

No caso de resultados claramente positivos ou claramente negativos (ver o primeiro parágrafo do ponto 2.3), pode bastar o ensaio primário, apoiado num ou mais ensaios preliminares de determinação da gama de concentrações.

▼B

Os resultados duvidosos, no limite ou pouco claros devem ser esclarecidos por novos ensaios (ver também o segundo parágrafo do ponto 2.4). Nesses casos, deve ser ponderada a modificação das condições experimentais. Entre as condições experimentais susceptíveis de ser modificadas contam-se a gama de concentrações ou o intervalo entre concentrações, o tempo de pré-incubação e o tempo de exposição à irradiação. No caso das substâncias químicas instáveis na água, pode ser adequado um tempo de exposição mais curto.

2.2. AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

Para possibilitar a avaliação dos resultados, pode ser calculado um factor de fotoirritação (PIF) ou um fotoefeito médio (MPE).

Para que os cálculos baseados nas medições de fototoxicidade possam ser efectuados (ver abaixo), o conjunto das respostas individuais obtidas em função da concentração deve ser traduzido por uma curva (modelo) contínua de concentrações apropriada. O ajustamento da curva aos resultados é normalmente efectuado por um método de regressão não linear (18). Para avaliar a influência da variabilidade dos resultados na curva ajustada recomenda-se uma técnica de *bootstrap*.

O cálculo do factor de fotoirritação (PIF) é efectuado do seguinte modo:

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{IC}_{50}(-\mathrm{Irr})}{\mathrm{IC}_{50}(+\mathrm{Irr})}$$

Se não for possível calcular a CI_{50} com irradiação ou a CI_{50} sem irradiação, não se poderá determinar o factor de fotoirritação (PIF) para a matéria em estudo. O fotoefeito médio (MPE) baseia-se na comparação das curvas de concentração completas (19). É definido como a média ponderada de um conjunto representativo de valores de fotoefeito:

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \mathrm{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

O fotoefeito PE_C à concentração C é definido como o produto do efeito de resposta RE_C pelo efeito de dose DE_C, ou seja: $PE_C = RE_C \times DE_C$. O efeito de resposta RE_C é a diferença entre as respostas observadas com e sem irradiação, isto é: $RE_C = R_c$ (- Irr) — R_c (+ Irr). O efeito de dose é calculado do seguinte modo:

$$\mathrm{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

em que C* representa a concentração de equivalência, ou seja, a concentração à qual a resposta + Irr é igual à resposta - Irr à concentração C. Se não for possível determinar C* por os valores de resposta da curva + Irr serem sistematicamente superiores ou inferiores à curva de resposta - Irr, o efeito de dose será fixado no valor «1». Os factores de ponderação w_i são dados pelo valor de resposta mais elevado, ou seja: $w_i = \mathrm{MAX}\ \{R_i (+ \mathrm{Irr}), R_i (- \mathrm{Irr})\}$. Os valores C_i de concentração são escolhidos de modo que cada intervalo de concentração definido pelos valores de concentração utilizados no ensaio contenha o mesmo número de pontos. O cálculo do MPE está limitado ao valor máximo de concentração ao qual pelo menos uma das duas curvas exiba ainda um valor de resposta mínimo de 10 %. Se essa concentração máxima exceder a concentração máxima utilizada no ensaio + Irr, a parte residual da curva + Irr será convertida no valor de resposta «0». Consoante o valor de MPE for maior ou menor do que um valor-limite de diferenciação convenientemente escolhido (MPE_C = 0,15), assim a substância química será ou não classificada de fototóxica.

▼B

Em (20) está disponível um programa para o cálculo do PIF e do MPE.

2.3. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Com base nas previsões do estudo de validação (8), se o PIF for inferior a 2 ou o MPE menor do que 0,1 a substância em estudo será não fototóxica. Se o PIF for superior a 2 e inferior a 5 ou o MPE maior do que 0,1 e menor do que 0,15, a substância em estudo será provavelmente fototóxica. Se o PIF for superior a 5 ou o MPE maior do que 0,15, a substância será fototóxica.

Os laboratórios que comecem a utilizar o presente método de ensaio devem ensaiar as matérias de referência constantes do quadro 1 antes de submeterem outras substâncias a determinações de fototoxicidade. Os valores de PIF e MPE devem ser próximos dos indicados no quadro 1.

Quadro 1

Denominação química	Número EINECS	Número CAS	PIF	MPE	Pico de absorção	Solvente [1]
Amiodarona HC1	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27 - 0,54	242 nm 300 nm (ombro)	Etanol
Cloropromazina HC1	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33 - 0,63	309 nm	Etanol
Norfloxacina	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34 - 0,90	316 nm	Acetonitrilo
Antraceno	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19 - 0,81	356 nm	Acetonitrilo
Protoporfirina IX, dissódio	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54 - 0,74	402 nm	Etanol
L-Histidina		[7006-35-1]	Não determinável	0,05 - 0,10	211nm	Água
Hexaclorofeno	200-733-8	[70-30-4]	1,1 - 1,7	0,00 - 0,05	299 nm 317nm (ombro)	Etanol
Laurilsulfato de sódio	205-788-1	[151-21-3]	1,0 - 1,9	0,00 - 0,05	Não se verifica absorção	Água

[1] Solvente utilizado nas medições de absorção.

2.4. INTERPRETAÇÃO DE DADOS

Se os efeitos fototóxicos só forem observados para a concentração de ensaio mais elevada (sobretudo no caso das substâncias químicas hidrossolúveis), poderá ser necessário ponderar outros factores na avaliação dos perigos da substância. Pode ser o caso de dados de absorção ou acumulação cutâneas da substância química e/ou de outros ensaios, por exemplo do ensaio *in vitro* da substância química em pele humana ou de animal ou em modelos cutâneos.

▼B

Se não for demonstrada a existência de toxicidade (+ Irr e - Irr) e se uma baixa solubilidade limitar as concentrações susceptíveis de serem ensaiadas, poderá ser posta em causa a compatibilidade da substância em estudo com o ensaio e deverá ser ponderada a realização de ensaios de confirmação, por exemplo com base noutro modelo.

3. **RELATÓRIOS**

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir, pelo menos, as seguintes informações:

Substância em estudo:

— Dados identificativos, denominações genéricas comuns e números IUPAC e CAS, se forem conhecidos;

— Natureza fisica e grau de pureza;

— Propriedades físico-químicas relevantes para o estudo;

— Espectro de absorção no visível/UV;

— Estabilidade e fotoestabilidade, se forem conhecidas.

Solvente:

— Justificação da escolha do solvente;

— Solubilidade da substância em estudo no solvente;

— Percentagem de solvente no meio de tratamento.

Células:

— Tipo e origem das células;

— Ausência de micoplasmas;

— Número de repicagens celulares, se for conhecido;

— Sensibilidade celular à radiação, determinada com o equipamento de irradiação utilizado no ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU.

Condições de ensaio — 1) *Incubação antes e depois do tratamento:*

— Tipo e composição do meio de cultura;

— Condições de incubação (concentração de CO_2, temperatura e humidade);

— Duração da incubação (antes e depois do tratamento).

Condições de ensaio — 2) *Tratamento com a substância química:*

— Fundamentação da escolha das concentrações da substância química em estudo utilizadas nos ensaios com e sem irradiação;

— Caso a substância química em estudo seja fracamente solúvel e não citotóxica, fundamentação da escolha da maior concentração ensaiada;

— Tipo e composição do meio de tratamento (tampão salino);

— Duração do tratamento químico.

Condições de ensaio — 3) *Irradiação:*

— Fundamentação da escolha da fonte luminosa utilizada;

▼B

— Fabricante e tipo da fonte luminosa e do radiómetro;

— Características de irradiância espectral da fonte luminosa;

— Características de transmissão e absorção do filtro ou filtros utilizados;

— Características do radiómetro e condições de calibração do mesmo;

— Distância entre a fonte luminosa e o sistema de ensaio;

— Irradiância UVA a essa distância, expressa em mW/cm^2;

— Duração da exposição à radiação UV/luz visível;

— Dose de radiação UVA (irradiância x tempo), expressa em J/cm^2;

— Temperatura das culturas celulares durante a irradiação e das culturas celulares mantidas paralelamente na obscuridade.

Condições de ensaio — 4) *Ensaio de viabilidade com o vermelho neutro:*

— Composição do meio de tratamento com vermelho neutro;

— Duração da incubação com vermelho neutro;

— Condições de incubação (concentração de CO_2, temperatura e humidade);

— Condições de extracção do vermelho neutro (agente de extracção, duração);

— Comprimento de onda utilizado na leitura espectrofotométrica da densidade óptica do vermelho neutro;

— Segundo comprimento de onda (referência), se for utilizado;

— Composição do branco eventualmente utilizado no espectrofotómetro.

Resultados:

— Viabilidade celular obtida para cada concentração da substância química em estudo, expressa em percentagem da viabilidade média das amostras de controlo paralelas;

— Curvas de concentração (viabilidade celular relativa em função da concentração da substância química em estudo) obtidas nos ensaios + Irr e - Irr paralelos;

— Análise das curvas de concentração: se possível, cálculo automático/cálculo manual de CI_{50} (+ Irr) e de CI_{50} (- Irr);

— Comparação das duas curvas de concentração obtidas com e sem irradiação, por cálculo do factor de fotoirritação (PIF) ou do fotoefeito médio (MPE);

— Critérios de aceitação do ensaio — amostra de controlo constituída pelo solvente paralela;

— Viabilidade absoluta (densidade óptica do extracto de vermelho neutro) das células irradiadas e não irradiadas;

— Dados de referência das amostras de controlo negativas (solvente); médias e desvios-padrão;

— Critérios de aceitação do ensaio — amostra de controlo positiva paralela;

▼B

— CI_{50}(+ Irr) e CI_{50}(- Irr) e PIF/MPE da substância química da amostra de controlo positiva;

— Dados de referência da substância química da amostra de controlo positiva: CI_{50}(+ Irr) e CI_{50}(- Irr) e PIF/MPE; médias e desvios-padrão.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Lovell W.W., (1993) A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxicology *In Vitro* 7, p. 95-102.

(2) Santamaria, L. and Prino, G., (1972) List of the photodynamic substances. In «Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry» Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p. XI-V.

(3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D., (1994) *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, p. 314-348.

(4) Spikes, J.D., (1989) Photosensitisation. In «The science of Photobiology» Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p. 79-110.

(5) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 7 «Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water» Environment Directorate, OECD, Paris.

(6) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A., (1994) EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxicology *In Vitro* 8, p. 793-796.

(7) Anon (1998) Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, p. 7-8.

(8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P., (1998) The international EU/-COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxicology *In Vitro* 12, p. 305-327.

(9) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

(10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A., (1985) Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett. 24, p. 119-124.

(11) Hay, R.J., (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, p. 225-237.

▼B

(12) Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A., (1996) Animal models for phototoxicity testing. In «Dermatotoxicology», edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p. 515-530.

(13) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, p. 1825-1829.

(14) ISO 10977., (1993) Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.

(15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275

(16) ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998 (18 páginas).

(17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U., (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, p. 679-708.

(18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J., (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, p. 127-138.

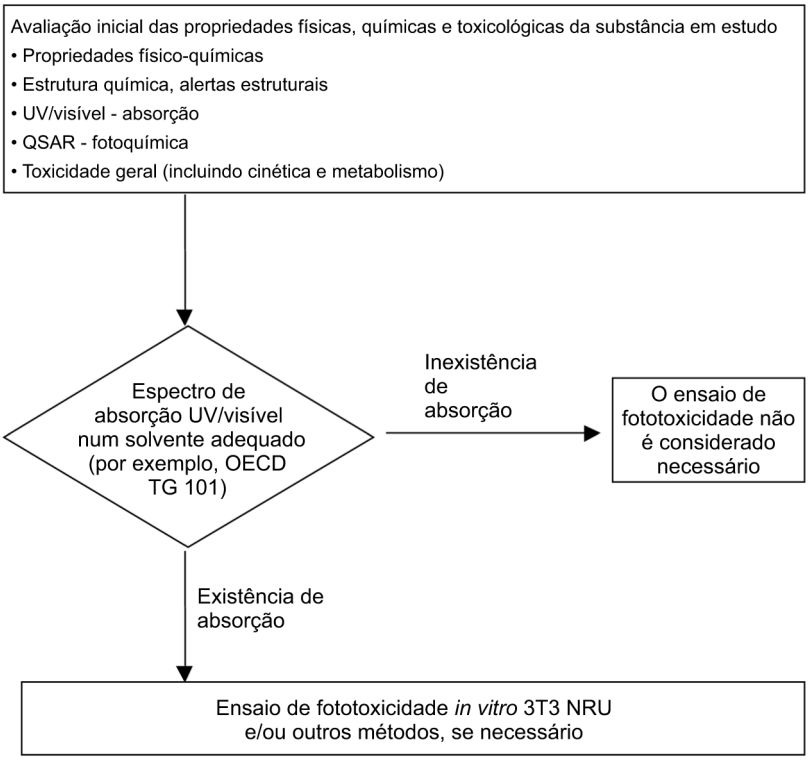
(19) Holzhütter, H.G., (1997) A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, p. 445-462.

(20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

ANEXO 1

Papel do ensaio de fitotoxicidade 3T3 NRU numa abordagem sequencial da determinação da fitotoxicidade de substâncias químicas

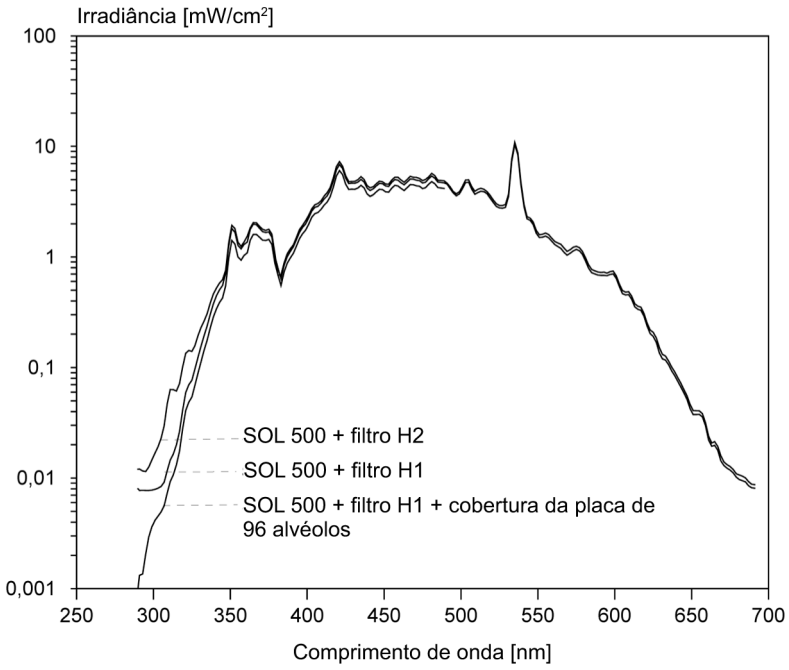


▼B

ANEXO 2

Figura 1

Distribuição espectral da potência de um simulador de luz solar com filtros



(Ver segundo parágrafo do ponto 1.4.1.5.)

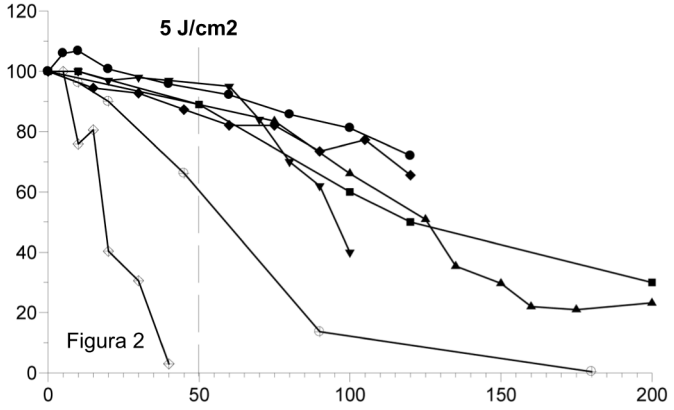
A figura 1 apresenta um exemplo de uma distribuição espectral de irradiância aceitável de um simulador de luz solar com filtros, proveniente da fonte de halogeneto metálico dopada utilizada no estudo de validação do ensaio de fototoxicidade 3T3 NRU (6)(8)(17). Mostra-se o efeito de dois filtros diferentes e o efeito filtrante suplementar da cobertura da placa de cultura celular com 96 alvéolos. O filtro H2 só foi utilizado com sistemas de ensaio que toleram doses mais elevadas de UVB (ensaio em modelo cutâneo e ensaio da foto-hemólise de glóbulos vermelhos). No ensaio de fototoxicidade 3T3 NRU foi utilizado o filtro H1. A figura mostra que o efeito filtrante adicional da cobertura da placa é sobretudo observado nos UVB e que o espectro de irradiação continua a ter radiação UVB suficiente para excitar as substâncias químicas que absorvem sobretudo nessa região espectral, como a Amiodarona (ver quadro 1).

▼B

Figura 2

Sensibilidade das células Balb/c 3T3 à irradiação (medida nos UVA)

Viabilidade celular (percentagem de absorção do vermelho neutro em relação às amostras de controlo mantidas na obscuridade)



(Ver segundo parágrafo do ponto 1.4.1.5.2 e os pontos 1.4.2.2.1 e 1.4.2.2.2.)

Sensibilidade das células Balb/c 3T3 à irradiação com o simulador de luz solar utilizado no estudo de validação do ensaio de fototoxicidade 3T3 NRU, medida nos UVA. A figura mostra os resultados obtidos no estudo de pré-validação em sete laboratórios distintos (1). As cinco curvas com símbolos a cheio dizem respeito a células com tolerância aceitável à irradiação; as outras duas curvas foram obtidas com células envelhecidas (resultantes de numerosas repicagens), que foi necessário substituir por novas células-mãe.

Com base nestes dados, foi determinada para dose mais elevada de irradiação não citotóxica (linha vertical a tracejado) o valor 5 J/cm. A linha horizontal a tracejado corresponde ao efeito máximo aceitável da irradiação a que se refere o ponto 1.4.2.2.

▼M3

B.42. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA: ENSAIO DE GÂNGLIOS LINFÁTICOS LOCAIS

INTRODUÇÃO

1. As Diretrizes da OCDE para o ensaio de produtos químicos (*OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*) e os métodos de ensaio da UE nelas baseados são revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas em evolução e de considerações de bem-estar animal. Foi adotada anteriormente a versão original do método de ensaio de gânglios linfáticos locais para determinação da sensibilização cutânea no rato (método LLNA, de «*Local Lymph Node Assay*», *Test Guideline* 429 da OCDE, capítulo B.42 deste anexo) (1). Foram publicados em (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) elementos pormenorizados sobre a validação do referido método, bem como uma revisão dos trabalhos conexos. Com base na avaliação da experiência adquirida e dos dados científicos, procedeu-se à atualização do método LLNA (12). O presente ensaio é o segundo método concebido para avaliar o potencial de sensibilização da pele de animais por produtos químicos (substâncias e misturas). O outro método (*Test Guideline* 406 da OCDE, capítulo B.6 deste anexo) recorre a ensaios em cobaias, nomeadamente o ensaio de maximização na cobaia e o ensaio de Buehler (13). No que respeita ao bem-estar animal, o método LLNA é melhor do que o método B.6 e o *Test Guideline* 406 da OCDE (13). O presente método LLNA atualizado inclui uma série de normas de desempenho (apêndice 1), que podem ser utilizadas como elemento de validação de métodos de ensaio novos ou modificados, funcional e mecanisticamente similares ao método LLNA, em conformidade com os princípios do documento de orientação (*Guidance Document*) n.º 34 da OCDE (14).

2. O método LLNA estuda a fase de indução da sensibilização cutânea e fornece dados quantitativos adequados para a avaliação da resposta à dosagem. Note-se que os sensibilizantes ligeiros/moderados recomendados como produtos químicos de controlo positivo adequados para métodos de ensaio em cobaias (método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (13) também o são para o método LLNA (6) (8) (15). Neste método descreve-se, como possibilidade alternativa, uma abordagem LLNA reduzida (método rLLNA) que permite diminuir o número de animais utilizados numa percentagem que pode ir até 40 % (16) (17) (18). Pode recorrer-se a este método reduzido quando a regulamentação exigir que seja confirmada uma previsão negativa de potencial de sensibilização cutânea, desde que sejam observadas todas as outras especificações do protocolo LLNA aqui descritas. Uma previsão de resultado negativo deve basear-se em todas as informações disponíveis, como se refere no ponto 4. Antes de se recorrer ao método rLLNA, é necessário justificar claramente e fundamentar cientificamente a utilização do método. Se, contrariamente ao esperado, o método rLLNA der resultados positivos ou inconclusivos, pode ser necessário efetuar mais ensaios para interpretar ou clarificar os resultados obtidos. O método rLLNA não deve ser utilizado em estudos de identificação de perigos associados a substâncias sensibilizantes da pele quando forem necessárias informações de resposta à dosagem, como na subcategorização para efeitos do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, e do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU.

DEFINIÇÕES

3. As definições utilizadas figuram no apêndice 2.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

4. O método LLNA constitui um método alternativo a utilizar na identificação de produtos químicos potencialmente sensibilizantes da pele. Isso não implica, necessariamente, que o método deve ser sempre utilizado em substituição de ensaios em cobaias (método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (13), mas apenas que é equivalente aos segundos e pode ser utilizado em alternativa, gerando normalmente resultados positivos ou negativos que dispensam confirmação. Antes de efetuar o estudo, o laboratório deve examinar todas as informações disponíveis sobre a substância

▼M3

em causa, nomeadamente a identificação e a estrutura química, as propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* da substância e dados toxicológicos sobre produtos químicos com estrutura semelhante. Esse exame destina-se a determinar se o método LLNA se adequa à substância (dada a incompatibilidade de alguns tipos de produtos químicos com o método LLNA – ver o ponto 5), bem como a facilitar a escolha das dosagens.

5. O método LLNA é um método *in vivo*, não eliminando, portanto, a utilização de animais na avaliação da atividade sensibilizante alérgica por contacto. Pode, no entanto, reduzir o número de animais utilizados para estes fins. Além disso, proporciona melhorias substanciais (menos dor e sofrimento) no modo como os animais são utilizados nos ensaios de sensibilização alérgica por contacto. O método LLNA baseia-se na observação de ocorrências imunológicas estimuladas por produtos químicos durante a fase indutora da sensibilização. Contrariamente aos ensaios em cobaias (método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (13), não exige a indução de reações de hipersensibilidade dérmica por agentes externos. Também não implica a utilização de nenhum adjuvante, ao contrário do que sucede no ensaio de maximização na cobaia (13), reduzindo assim a dor e sofrimento causados aos animais. Apesar das vantagens do método LLNA em relação ao método B.6 e ao *Test Guideline* 406 da OCDE, importa reconhecer que o método tem limitações que podem exigir o recurso a estes últimos (13) (por exemplo, falsos negativos no método LLNA para certos metais, falsos positivos para certos irritantes cutâneos – como no caso de alguns produtos químicos tensioativos (19) (20) – ou problemas de solubilidade da substância em estudo). Por outro lado, no caso das substâncias ou classes de substâncias químicas com grupos funcionais que, comprovadamente, suscitem dúvidas (21), pode ser necessário recorrer a ensaios em cobaias (método B.6; *Test Guideline* 406 da OCDE) (13). Além disso, tendo em conta a base de dados de validação – limitada e essencialmente constituída por formulações pesticidas –, é mais provável que o método LLNA dê resultados positivos para este tipo de substância em estudo do que o ensaio na cobaia (22). Todavia, ao testar formulações, pode encarar-se a possibilidade de incluir, como substâncias de referência, substâncias similares com resultados conhecidos, para demonstrar que o método LLNA funciona bem (ver o ponto 16). Salvaguardadas estas limitações, o método LLNA é potencialmente aplicável ao estudo de qualquer substância, a menos que esta possua alguma propriedade passível de comprometer a exatidão do método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

6. O princípio básico subjacente ao método LLNA é que os sensibilizantes induzem uma proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos drenantes do local de aplicação da substância em estudo. Esta proliferação é proporcional à dosagem e à potência do alergénio aplicado e constitui um modo simples de obter uma medida quantitativa da sensibilização. Mede-se a proliferação e compara-se a proliferação média em cada grupo estudado com a proliferação média no grupo de controlo tratado com o excipiente. Determina-se a razão entre a proliferação média em cada grupo tratado e a proliferação observada em paralelo no grupo de controlo tratado com o excipiente; essa razão é denominada índice de estimulação (IE). Para que uma substância em estudo possa ser classificada de sensibilizante cutânea potencial, este índice deve ser ≥ 3. O presente método baseia-se no recurso à marcação radioativa *in vivo* para medir o aumento de número de células em proliferação nos gânglios linfáticos drenantes do sistema auricular. Podem, no entanto, utilizar-se outros indicadores para determinar o número de células em proliferação, desde que as normas de desempenho sejam totalmente cumpridas (apêndice 1).

▼M3

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Escolha da espécie animal

7. O rato é a espécie escolhida para este ensaio. Utilizam-se fêmeas adultas das estirpes CBA/Ca ou CBA/J, nulíparas e não grávidas. No início do estudo, os animais devem ter entre 8 e 12 semanas; a variação de peso dos animais entre si deve ser mínima e não deve exceder 20 % do peso médio dos mesmos. Podem ser utilizadas outras estirpes, bem como machos, quando houver dados suficientes que demonstrem não existirem diferenças significativas na resposta ao método LLNA relacionadas com a estirpe e/ou o sexo do animal.

Condições de alojamento e de alimentação

8. Os ratos devem ser alojados em grupo (23), a menos que se justifique cientificamente o seu alojamento individual. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa não deve ser inferior a 30 % e, de preferência, não deve exceder 70 %, exceto durante a limpeza do biotério. Idealmente, deve procurar manter-se entre 50 % e 60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

Preparação dos animais

9. Os animais são selecionados aleatoriamente, marcados de modo a permitir a identificação individual (mas não por marcação nas orelhas) e mantidos em gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes da aplicação das doses, para permitir a aclimatação às condições do laboratório. Antes do início do tratamento, examinam-se os animais, de modo a assegurar que não apresentam lesões cutâneas visíveis.

Preparação das soluções a aplicar

10. Os produtos químicos sólidos dissolvem-se ou suspendem-se em solventes/ /excipientes e, se necessário, diluem-se, antes da aplicação nas orelhas dos ratos. Os produtos líquidos podem ser aplicados tal e qual ou ser diluídos antes da aplicação. Os produtos químicos insolúveis, como os geralmente presentes nos dispositivos médicos, devem ser sujeitos a um processo de extração exaustivo com um solvente apropriado, a fim de nele concentrar para o ensaio todos os componentes extraíveis, antes da aplicação nas orelhas dos ratos. As substâncias em estudo devem ser preparadas diariamente, a menos que haja dados de estabilidade que demonstrem ser aceitável o seu armazenamento.

Verificação da fiabilidade

11. Utilizam-se produtos químicos de controlo positivo para demonstrar o desempenho adequado do ensaio, devendo obter-se uma resposta quantitativamente bem caracterizada, com sensibilidade adequada e reprodutível, a essas substâncias sensibilizantes. Recomenda-se a inclusão, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para demonstrar a competência do laboratório na execução de cada ensaio e possibilitar a avaliação da reprodutibilidade e comparabilidade intra e interlaboratoriais. Algumas autoridades reguladoras exigem também um produto químico de controlo positivo em cada estudo, pelo que os laboratórios devem consultar as autoridades competentes antes de executarem o método LLNA. Aconselha-se, portanto, a utilização rotineira, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para evitar a eventual necessidade de ensaios suplementares em animais decorrente do recurso apenas periódico a esses produtos químicos de controlo (ver o ponto 12). No método LLNA, o produto químico de controlo positivo deve induzir uma resposta positiva a um nível de exposição do qual se espere um aumento do índice de estimulação superior a 3 em relação ao grupo de controlo negativo. Deve escolher-se a dosagem do produto químico de controlo positivo de modo que este não cause irritação cutânea excessiva nem toxicidade sistémica e que a indução seja reprodutível, mas não excessiva

▼M3

(considera-se excessivo um índice de estimulação superior a 20). Os produtos químicos de controlo positivo preferidos são aldeído hexilcinâmico (n.º CAS 101-86-0) a 25 % numa mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1 e mercaptobenzotiazol (n.º CAS 149-30-4) a 5 % em *N,N*-dimetilformamida (ver o apêndice 1, quadro 1). Em certas circunstâncias, e perante justificação adequada, podem utilizar-se outros produtos químicos de controlo positivo que cumpram os critérios atrás referidos.

12. Embora seja recomendada a inclusão, em paralelo, de um grupo de controlo positivo, em algumas situações pode justificar-se que um laboratório que aplique o método LLNA regularmente (isto é, pelo menos uma vez por mês) efetue ensaios de controlo positivo apenas periódicos (a intervalos não superiores a seis meses) e mantenha uma base de dados histórica dos produtos químicos de controlo positivo que comprove a capacidade do laboratório de obter resultados reprodutíveis e exatos com esses produtos. A competência na execução do método LLNA pode demonstrar-se obtendo resultados positivos constantes com um produto químico de controlo positivo em pelo menos 10 ensaios independentes efetuados num período razoável (menos de um ano).

13. Deve incluir-se em paralelo um grupo de controlo positivo sempre que haja alguma alteração processual do método LLNA (por exemplo, alterações do pessoal formado, das matérias e/ou dos reagentes utilizados no método de ensaio, do equipamento utilizado neste último ou da origem dos animais estudados), devendo essas alterações ser documentadas nos relatórios laboratoriais. Deve analisar-se a incidência dessas alterações na adequação da base de dados históricos anteriormente estabelecida, ponderando a necessidade de criar uma nova base de dados históricos para documentar a coerência dos resultados obtidos com os produtos químicos de controlo positivo.

14. Os investigadores devem ter presente que a decisão de efetuar o estudo de produtos químicos de controlo positivo periodicamente, e não em paralelo, tem implicações na adequação e aceitabilidade dos resultados negativos dos estudos efetuados sem produto químico de controlo positivo em paralelo, no intervalo entre cada estudo de controlo positivo periódico. Por exemplo, se for obtido um resultado falso negativo num estudo de controlo positivo periódico, podem questionar-se os resultados negativos eventualmente obtidos para as substâncias em estudo no período compreendido entre o último estudo periódico aceitável de controlo positivo e o estudo periódico inaceitável de controlo positivo. Ao optar entre a inclusão em paralelo de produtos químicos de controlo positivo e um controlo positivo apenas periódico, devem ponderar-se cuidadosamente as consequências. Deve também ponderar-se a utilização de menos animais no grupo de controlo positivo em paralelo, se houver justificação científica para isso e o laboratório demonstrar, com base em dados históricos próprios, que podem ser utilizados menos ratos (12).

15. Embora se deva ensaiar o produto químico de controlo positivo num excipiente que reconhecidamente garanta coerência nas respostas (por exemplo, acetona e azeite na proporção volúmica 4:1), em determinadas situações regulamentares poderá ser também necessário efetuar o ensaio num excipiente não convencional (formulação clínica ou quimicamente pertinente) (24). Se o ensaio em paralelo de um produto químico de controlo positivo for efetuado com um excipiente diverso do da substância em estudo, deve incluir-se um controlo de excipiente para o produto químico de controlo positivo ensaiado em paralelo.

16. Se o estudo consistir na avaliação de substâncias de uma determinada classe química ou gama de respostas, o recurso a substâncias de referência pode ser útil para demonstrar que o método de ensaio funciona corretamente na deteção do potencial de sensibilização cutânea do tipo de substância em causa. Para que seja considerada adequada, uma substância de referência deve possuir as seguintes propriedades:

— semelhança estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo,

— características físico-químicas conhecidas,

— dados corroborantes do método LLNA,

— dados corroborantes de outros modelos animais e/ou de ensaios em pessoas.

▼M3

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Número de animais e níveis de dosagem

17. Utilizam-se, no mínimo, quatro animais por grupo de dosagem e um mínimo de três concentrações da substância em estudo, além de um grupo de controlo negativo em paralelo, tratado apenas com o excipiente da substância em estudo, e de um produto químico de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 14). Deve ponderar-se o ensaio de várias doses do produto químico de controlo positivo, sobretudo quando este for ensaiado com intermitência. Os animais dos grupos de controlo devem ser manuseados e tratados de modo idêntico ao dos animais dos grupos tratados, exceto no que respeita à administração da substância em estudo.

18. A escolha da dosagem e do excipiente deve basear-se nas recomendações das referências (3) e (5). Selecionam-se normalmente doses consecutivas numa série de concentrações adequada, por exemplo, 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. A seleção das séries de concentração utilizadas deve ter fundamentação científica. Na escolha de três concentrações consecutivas de modo que a concentração mais elevada maximize a exposição, evitando ao mesmo tempo a ocorrência de toxicidade sistémica e irritação cutânea local excessiva, devem ser tidas em conta as informações toxicológicas (por exemplo, referentes a toxicidade aguda e irritação dérmica), bem como estruturais e físico-químicas, disponíveis sobre a substância em estudo (e/ou sobre substâncias estruturalmente afins) (3) (25). Na ausência de tais informações, pode ser necessário um ensaio exploratório prévio (ver os pontos 21 a 24).

19. O excipiente não deve interferir no resultado do ensaio nem distorcê-lo, devendo ser escolhido de modo a maximizar a solubilidade e a obter a maior concentração possível numa solução ou suspensão adequada para aplicação da substância em estudo. Constituem excipientes adequados uma mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1, a *N,N*-dimetilformamida, a metiletilcetona, o propilenoglicol e o sulfóxido dimetílico (19), mas podem utilizar-se outros, desde que com fundamentação científica. Em certas situações, pode ser necessário efetuar um controlo adicional com um solvente utilizado na prática clínica ou a formulação na qual a substância em estudo é comercializada. Deve ter-se especial cuidado em assegurar que as substâncias hidrófilas sejam incorporadas num sistema (excipiente) que molhe a pele e não escorra de imediato, acrescentando solubilizadores adequados (por exemplo, Pluronic® L92 a 1 %). Devem, portanto, evitar-se os excipientes totalmente aquosos.

20. A utilização de gânglios linfáticos de ratos distintos possibilita a avaliação da variabilidade de animal para animal e a comparação estatística da diferença entre as medições relativas à substância em estudo e ao grupo de controlo do excipiente (ver o ponto 35). Por outro lado, se se dispuser de dados por animal, pode ponderar-se a redução do número de ratos no grupo de controlo positivo (12). Além disso, há autoridades reguladoras que exigem a apresentação de dados por animal. Todavia, algumas autoridades reguladoras podem aceitar a agregação de dados relativos a vários animais, caso em que os utentes podem optar por dados individualizados por animal ou pela agregação de dados relativos a séries de animais.

Ensaio exploratório prévio

21. Na ausência de informações que permitam determinar a dosagem máxima a ensaiar (ver o ponto 18), é necessário efetuar um ensaio exploratório prévio, a fim de definir a dosagem adequada a ensaiar pelo método LLNA. O objetivo deste ensaio exploratório consiste em fornecer orientações para a escolha da dosagem máxima a utilizar no estudo principal pelo método LLNA, caso não se disponha de informações sobre a concentração que induz toxicidade sistémica (ver o ponto 24) e/ou irritação cutânea local excessiva (ver o ponto 23). A dosagem máxima estudada deve ser uma concentração de 100 % da substância em estudo, no caso dos líquidos, ou a concentração máxima possível, no caso dos sólidos e das suspensões.

▼M3

22. O ensaio exploratório prévio é efetuado em condições idênticas às do estudo principal pelo método LLNA, mas não se avalia a proliferação nos gânglios linfáticos e podem utilizar-se menos animais por grupo de dosagem. Sugere-se o recurso a um ou dois animais por grupo de dosagem. Observam-se diariamente todos os ratos para verificar se apresentam sinais clínicos de toxicidade sistémica ou de irritação no local de aplicação. Regista-se o peso corporal de cada rato antes do ensaio e antes de o eutanasiar (dia 6). Observam-se as orelhas para verificar se têm eritema e atribui-se-lhes uma pontuação de acordo com o quadro 1 (25). Mede-se a espessura das orelhas com um instrumento adequado – por exemplo, um micrómetro digital ou um leitor de espessuras da Peacock – no dia 1 (antes da primeira dose), no dia 3 (cerca de 48 horas após a primeira dose) e no dia 6. Complementarmente, no dia 6 pode determinar-se a espessura das orelhas por pesagem de punções auriculares efetuadas depois da eutanásia dos animais. Uma pontuação de eritema ≥ 3 e/ou o aumento da espessura auricular em 25 % ou mais, em qualquer dia de medição, constituem indicadores de irritação cutânea local excessiva (26) (27). Para dosagem mais elevada no estudo principal pelo método LLNA, deve ser escolhida a dosagem da série de concentrações do ensaio exploratório prévio (ver o ponto 18) imediatamente inferior à que induz toxicidade sistémica e/ou irritação cutânea local excessiva.

Quadro 1

Pontuações de eritema

Observação	Pontuação
Ausência de eritema	0
Eritema muito ligeiro (quase impercetível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a intenso	3
Eritema intenso (vermelhidão roxa) ou formação de escara que impede a pontuação do eritema	4

23. Além do referido acerca do aumento de 25 % da espessura auricular (26) (27), também se recorreu a aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular dos ratos tratados, comparativamente aos ratos de controlo, para identificar produtos irritantes pelo método LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Os aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular inferiores a 25 % não foram, porém, especificamente associados a irritação excessiva (30) (32) (33) (34).

24. Quando efetuadas no âmbito de uma avaliação integrada, as seguintes observações clínicas podem indiciar toxicidade sistémica (35) (36), podendo assim indicar a dosagem máxima a utilizar no método LLNA principal: alterações do funcionamento do sistema nervoso (por exemplo, piloereção, ataxia, tremores e convulsões); alterações comportamentais (por exemplo, agressividade, alterações das atividades higiénicas, alterações pronunciadas de atividade); alterações respiratórias (alterações da frequência e da intensidade da respiração, como dispneia, arfar e pieira) e da ingestão de alimentos e de água. Devem ainda ser tidos em conta na avaliação os sinais de letargia e/ou de apatia e quaisquer sinais clínicos de dor ou sofrimento mais do que ligeiros ou momentâneos, ou reduções de peso corporal superiores a 5 % entre o dia 1 e o dia 6, bem como a mortalidade. Os animais moribundos e os animais que manifestem sofrimento ou sinais de dor intensa e continuada devem ser eutanasiados (37).

▼M3

Sequência experimental do estudo principal

25. A sequência experimental do ensaio é a seguinte:

— *Dia 1:* Identificar individualmente e anotar o peso de cada animal e todas as observações clínicas. Aplicar no dorso de cada orelha 25 µl da diluição adequada da substância em estudo, do excipiente sozinho ou do produto químico de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 15).

— *Dias 2 e 3:* Repetir o procedimento de aplicação efetuado no dia 1.

— *Dias 4 e 5:* Nenhum tratamento.

— *Dia 6:* Anotar o peso de cada animal. Injetar, através da veia caudal, 250 µl de tampão salino de fosfato (PBS) esterilizado contendo 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) de ^{3}H-metiltimidina em todos os ratos do estudo e de controlo. Em alternativa, injetar 250 µl de PBS esterilizado, contendo 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) de ^{125}I-iododesoxiuridina numa concentração 10^{-5} M em fluorodesoxiuridina, em todos os ratos, através da veia caudal. Eutanasiar os animais 5 horas depois. Excisar os gânglios linfáticos auriculares de drenagem, das orelhas de cada rato, e colocá-los em PBS, separadamente para cada animal (procedimento por animal); em alternativa, excisar os gânglios linfáticos de cada orelha e colocá-los agrupados em PBS, por grupo de tratamento (procedimento do tratamento agrupado). Para pormenores e esquemas da identificação e dissecação dos gânglios linfáticos, ver a referência (12). A fim de melhor avaliar a resposta cutânea local no estudo principal, podem ser incluídos no protocolo de estudo parâmetros suplementares, como a pontuação do eritema auricular ou medições da espessura auricular (com um medidor de espessura ou por pesagem de punções auriculares *post mortem*).

Preparação das suspensões celulares

26. Preparar suspensões unicelulares de células dos gânglios linfáticos, excisados bilateralmente, aplicando o procedimento por animal ou, em alternativa, o procedimento do tratamento agrupado, por desagregação mecânica suave através de um peneiro de aço inoxidável com malha de 200 µm, ou recorrendo a outra técnica aceitável para obtenção de suspensões unicelulares. Lavar duas vezes as células com PBS em excesso e precipitar o ADN com ácido tricloroacético a 5 %, a 4 °C, durante 18 horas (3). Ressuspender os sedimentos em 1 ml de ácido tricloroacético e transferir a suspensão para frascos de contador de cintilações contendo 10 ml de fluido de cintilação, para contagem de ^{3}H, ou diretamente para tubos de contagem gama, para contagem de ^{125}I.

Determinação da proliferação celular (radioatividade incorporada)

27. Medir a incorporação de ^{3}H-metiltimidina por contagem de cintilação β, em desintegrações por minuto (DPM). Medir a incorporação de ^{125}I-iododesoxiuridina por contagem de ^{125}I, exprimindo-a igualmente em DPM. Consoante o procedimento seguido, a incorporação é expressa em DPM/ /rato (procedimento por animal) ou em DPM/grupo de tratamento (procedimento do tratamento agrupado).

Método LLNA reduzido

28. Em determinadas situações, quando a regulamentação exigir que se confirme uma previsão negativa de potencial de sensibilização cutânea, pode recorrer-se a um protocolo rLLNA facultativo (16) (17) (18) que utiliza menos animais, desde que sejam observadas todas as outras especificações do protocolo LLNA aqui descritas. Antes de se recorrer ao método rLLNA, é necessário justificar claramente com base em argumentos científicos a utilização do método. Se forem obtidos resultados positivos ou inconclusivos, pode ser necessário efetuar mais ensaios para interpretar ou clarificar esses resultados.

▼M3

29. A redução numérica dos grupos de dosagem é a única diferença entre os protocolos de ensaio dos métodos LLNA e rLLNA, razão pela qual este último não permite obter informações de resposta à dosagem. Não deve, portanto, recorrer-se ao método rLLNA quando essas informações forem necessárias. Tal como no método de multidosagem LLNA, no método rLLNA avalia-se a concentração máxima da substância em estudo que não induz toxicidade sistémica manifesta nem irritação cutânea local excessiva no rato (ver o ponto 18).

OBSERVAÇÕES

Observações clínicas

30. Observar cuidadosamente cada rato pelo menos uma vez por dia, com vista à deteção de sinais clínicos, quer de irritação local no ponto de aplicação, quer de toxicidade sistémica. Anotar todas as observações, mantendo um registo para cada rato. Os planos de controlo devem incluir critérios para identificar prontamente os ratos que evidenciem níveis de toxicidade sistémica, irritação cutânea local excessiva ou corrosão da pele passíveis de justificarem a eutanásia do animal (37).

Pesos corporais

31. Tal como referido no ponto 25, mede-se o peso corporal de cada animal no início do ensaio e quando da eutanásia programada.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

32. Os resultados correspondentes a cada grupo de tratamento exprimem-se em índice de estimulação. Caso se utilize o procedimento por animal, determina-se o índice de estimulação dividindo a média de DPM/rato, correspondente a cada grupo tratado com a substância em estudo e ao grupo de controlo positivo, pela média de DPM/rato do grupo de controlo do solvente/excipiente. O índice de estimulação médio para o grupo de controlo tratado com o excipiente é igual a 1. Caso se utilize o tratamento agrupado, determina-se o índice de estimulação dividindo a incorporação radioativa agregada correspondente a cada grupo de tratamento pela incorporação agregada do grupo de controlo do excipiente. O valor obtido é um índice de estimulação médio.

33. Para efeitos de decisão, consideram-se positivos os resultados de índice de estimulação ≥ 3. Todavia, ao ponderar se um resultado próximo do limite deve ou não ser considerado positivo, podem ter-se também em conta o grau de resposta à dosagem, a significância estatística e a coerência das respostas correspondentes ao solvente/excipiente e à substância de controlo positivo (4) (5) (6).

34. Se for necessário clarificar os resultados obtidos, devem examinar-se as propriedades da substância em estudo, nomeadamente se esta possui estrutura semelhante a sensibilizantes cutâneos conhecidos ou causa irritação cutânea local excessiva nos ratos, bem como a natureza da resposta à dosagem observada. Na referência (7) analisam-se em pormenor estes e outros aspetos.

35. A recolha de dados de radioatividade para cada rato possibilita uma análise estatística da existência, nos dados, de indicações de resposta à dosagem e do grau desta resposta. A avaliação estatística pode incluir uma avaliação da resposta à dosagem e comparações, convenientemente adaptadas, de grupos estudados (por exemplo, comparações par a par de um grupo correspondente a uma determinada dosagem com o grupo de controlo tratado com o excipiente ensaiado em paralelo). As análises estatísticas podem incluir, por exemplo, regressões lineares ou testes de William, para analisar tendências de resposta à dosagem, e testes de Dunnett, para comparações par a par. Na escolha de um método de análise estatística apropriado, o investigador deve estar atento a possíveis divergências das variâncias e a outros problemas conexos passíveis de exigirem uma transformação dos dados ou uma análise estatística não paramétrica. O investigador pode ainda ter de efetuar os cálculos de índice de estimulação e as análises estatísticas considerando alguns pontos e descartando outros (por vezes denominados «aberrantes»).

▼M3

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

36. Os dados devem ser resumidos em quadros. Quando se seguir o procedimento por animal, indicar os valores de DPM correspondentes a cada animal, a média de DPM/animal do grupo, o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) e o índice de estimulação médio para cada grupo de dosagem, comparativamente ao grupo de controlo do excipiente ensaiado em paralelo. Quando se recorrer ao tratamento agrupado, indicar a média ou a mediana das desintegrações por minuto e o índice de estimulação médio de cada grupo de dosagem, comparativamente ao grupo de controlo do excipiente ensaiado em paralelo.

Relatório do ensaio

37. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Substâncias em estudo e de controlo:

— dados de identificação (por exemplo, números CAS e CE – caso existam –, origem, grau de pureza, impurezas conhecidas, número de lote),

— natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, volatilidade, estabilidade, solubilidade),

— no caso das misturas, composição e percentagens relativas dos componentes;

Solvente/excipiente:

— dados de identificação (grau de pureza, concentração – se adequado –, volume utilizado),

— justificação da escolha do excipiente;

Animais utilizados nos ensaios:

— origem dos ratos CBA,

— estado microbiológico dos animais, caso seja conhecido,

— número e idade dos animais,

— origem dos animais, condições de alojamento, dieta, etc.;

Condições de ensaio:

— elementos sobre a preparação e aplicação da substância em estudo,

— justificação das dosagens escolhidas, incluindo os resultados do ensaio exploratório prévio eventualmente efetuado,

— concentrações do excipiente e da substância em estudo utilizadas e quantidade total desta aplicada,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— elementos sobre a organização cronológica dos tratamentos e da colheita das amostras,

— métodos de medição da toxicidade,

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo ou negativo,

— elementos sobre eventuais desvios ao protocolo e explicação do modo como estes afetam a realização e os resultados do estudo;

Verificação da fiabilidade:

— resumo dos resultados da última verificação de fiabilidade, incluindo informações sobre a substância em estudo, a concentração e o excipiente utilizados,

— dados do laboratório relativos a controlos positivos ensaiados em paralelo e/ou históricos e a controlos negativos ensaiados em paralelo,

▼M3

— se não tiver sido efetuado em paralelo um controlo positivo, a data do controlo positivo periódico mais recente e o relatório laboratorial correspondente, bem como um relatório que especifique os dados históricos de controlos positivos do laboratório nos quais se baseou a decisão de não efetuar um controlo positivo paralelo;

Resultados:

— peso de cada rato no início da dosagem e na altura da sua morte programada, bem como a média e o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) para cada grupo de tratamento,

— surgimento e evolução de sinais de toxicidade, incluindo irritação dérmica no local da aplicação (caso ocorra), para cada animal,

— quadro de valores de DPM e de índices de estimulação para cada grupo de tratamento, por rato (procedimento por animal) ou em valor médio/da mediana (procedimento do tratamento agrupado),

— média e parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) de DPM/rato, para cada grupo de tratamento, e resultados da análise dos pontos aberrantes, também para cada grupo de tratamento, quando se aplica o procedimento por animal,

— índice de estimulação calculado e medida adequada da variabilidade de animal para animal, relativamente à substância em estudo e nos grupos de controlo, quando se aplica o procedimento por animal,

— resposta à dosagem,

— análises estatísticas que se justifiquem;

Análise dos resultados:

— comentário breve sobre os resultados obtidos; análise da resposta à dosagem, análises estatísticas que se justifiquem e conclusão sobre a classificação, ou não, da substância em estudo como sensibilizante cutânea.

REFERÊNCIAS

(1) OCDE (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429. Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) Kimber, I., Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. *Food Chem. Toxicol*., 30, 165-169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W., Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13-31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M., Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol*., 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I., Loveless, S.E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol*., 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol*., 36, 327-33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 249-257.

(12) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.pdf].

(13) OCDE (1992). Skin Sensitisation. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(14) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A., Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *J. Appl. Toxicol*., 18, 281-284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y., Basketter, D.A. (2006). The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.

(17) ESAC (2007). Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), Direção-Geral da Comissão Europeia, Centro Comum de Investigação, Instituto de Saúde e Proteção dos Consumidores, Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos, abril de 2007. Disponível em: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf].

(18) ICCVAM (2009). The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products. NIH Publication Number 09-6439. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/].

(19) ICCVAM (1999). The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No. 99-4494. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

▼M3

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C., Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R., Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. *Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions. NIH Publication Number 10-7512. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/].

(23) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7.ª edição. Washington, DC. National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.

(25) OCDE (2002). Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404. Paris, França. Disponível em: http: //www.oecd.org/document/4 0/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html].

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L., DeGeorge, G.L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009). Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam. niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S., Meade, B.J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P., Vohr, V.W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B., Meade, B.J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth*., 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B., Meade, B.J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R., Vohr, H.W. (2005). A European interlaboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W., Ahr, H.J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E., Germolec, D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) OCDE (1987). Acute Dermal Toxicity. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402. Paris, França. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/ /testguidelines].

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/ /Tox_workshop.htm].

(37) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼M3

Apêndice 1

Normas de desempenho para avaliação de métodos similares ou modificados propostos para ensaios LLNA de sensibilização cutânea

INTRODUÇÃO

1. O objetivo das normas de desempenho consiste em comunicar os termos com base nos quais é possível determinar se um método novo, sujeito ou não a direitos de propriedade (direitos de autor, marca comercial ou registo), é suficientemente exato e fiável para certas finalidades de ensaio. Estas normas baseiam-se em métodos de ensaio validados e aceites e podem ser utilizadas para avaliar a fiabilidade e exatidão de métodos similares (designados coloquialmente em inglês por «métodos "*me-too*" »), baseados em princípios científicos semelhantes e que medem ou preveem o mesmo efeito biológico ou tóxico (14).

2. Antes da adoção de métodos modificados (ou seja, aperfeiçoamentos a métodos de ensaio aprovados), deve avaliar-se o efeito das alterações propostas no desempenho do ensaio e em que medida essas alterações afetam as informações disponíveis para os outros componentes do processo de validação. Em função do número e da natureza das alterações propostas, dos dados de que se disponha e da documentação de apoio às alterações em causa, os métodos modificados devem ser sujeitos a um processo de validação idêntico ao descrito para um novo ensaio ou, se for caso disso, a uma avaliação limitada de fiabilidade e adequação com base em normas de desempenho estabelecidas (14).

3. Os métodos similares ou modificados cuja utilização no âmbito do presente método de ensaio seja proposta devem ser avaliados, com vista à determinação da sua fiabilidade e exatidão, utilizando produtos químicos representativos de toda a gama da escala de pontuação do método LLNA. Para evitar que sejam utilizados animais sem necessidade, recomenda-se vivamente que as entidades que desenvolvam os modelos consultem as autoridades competentes antes de iniciarem os estudos de validação com base nas normas de desempenho e orientações constantes do presente método.

4. Estas normas baseiam-se nas normas de desempenho harmonizadas dos E.U.A. (ICCVAM), da UE (ECVAM) e do Japão (JaCVAM) (12) para avaliação da validade de versões similares ou modificadas do método LLNA. As normas de desempenho são constituídas pelos componentes essenciais do método de ensaio, pelos produtos químicos de referência recomendados e por normas de exatidão e de fiabilidade que o método proposto deve cumprir ou suplantar.

I. **Componentes essenciais do método de ensaio**

5. Para garantir que um método LLNA similar ou modificado é funcional e mecanisticamente análogo ao método LLNA e mede o mesmo efeito biológico, devem constar do protocolo do método de ensaio os seguintes componentes:

— Aplicação tópica da substância em estudo em ambas as orelhas dos ratos;

— Medição da proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos drenantes do local de aplicação da substância em estudo;

— Medição da proliferação de linfócitos durante a fase indutora da sensibilização cutânea;

▼M3

— Escolha, como dosagem mais elevada da substância em estudo, da concentração máxima desta que não induz toxicidade sistémica nem irritação cutânea local excessiva nos ratos. Escolha, como dosagem mais elevada de um produto químico de referência de controlo positivo, de uma dose deste pelo menos tão elevada quanto a da estimativa da concentração necessária para gerar um índice de estimulação 3 (ver o quadro 1) sem causar toxicidade sistémica nem irritação cutânea local excessiva nos ratos;

— Inclusão em cada estudo, em paralelo, de um controlo do excipiente e, quando se justifique, também de um controlo positivo em paralelo;

— Utilização de pelo menos quatro animais por grupo de dosagem;

— Recolha de dados por animal ou agregados.

Se algum destes critérios não for preenchido, não é possível validar o método similar ou modificado com base nestas normas de desempenho.

II. **Lista mínima de produtos químicos de referência**

6. As normas de desempenho harmonizadas dos E.U.A. (ICCVAM), da UE (ECVAM) e do Japão (JaCVAM) (12) estabelecem uma lista mínima de 18 produtos químicos de referência a utilizar e quatro produtos químicos de referência facultativos (substâncias que geram resultados positivos falsos ou negativos falsos no método LLNA, comparativamente aos resultados obtidos em cobaias ou em pessoas – método B.6 ou *Test Guideline* 406 da OCDE – (13), podendo assim ser utilizados para demonstrar desempenhos iguais ao do método LLNA ou melhores) que são incluídos nas normas de desempenho do método LLNA. Os critérios de seleção desses produtos químicos foram os seguintes:

— A lista de produtos químicos de referência representa os tipos de substâncias normalmente utilizados para determinar potenciais de sensibilização cutânea e a gama de respostas que o método LLNA é capaz de medir ou de prever;

— A estrutura química das substâncias está bem definida;

— Dispõe-se para cada substância de dados de ensaios de gânglios linfáticos locais (método B.6 ou *Test Guideline* 406 da OCDE) (13) e, quando possível, de dados de ensaios em pessoas; e

— As substâncias estão facilmente disponíveis nos circuitos comerciais.

Os produtos químicos de referência recomendados constam do quadro 1. Nos estudos que recorram aos produtos químicos de referência propostos devem utilizar-se os excipientes correspondentes indicados no mesmo quadro. Se uma substância constante do quadro não estiver disponível, podem utilizar-se outras que preencham os critérios de escolha referidos, fundamentando devidamente esta opção.

▼M3

Quadro 1

Produtos químicos de referência recomendados para efeitos das normas de desempenho de métodos LLNA

Número	Produto químico (1)	N.º CAS	Estado	Excipiente (2)	EC3 (%) (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Intervalo efetivo da EC3	Método LLNA versus ensaio em cobaias	Método LLNA versus sensibilização humana
1	Mistura de 5-cloro2-metil4-isotiazolin3--ona (CMI) e 2-metil4-isotiazolin3-ona (MI) (5)	26172-55-4/ 2682-20-4	Líquido	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sólido	AAZ	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-Fenilenodiamina	106-50-3	Sólido	AAZ	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Cloreto de cobalto	7646-79-9	Sólido	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Isoeugenol	97-54-1	Líquido	AAZ	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-Mercaptobenzotiazole	149-30-4	Sólido	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	Líquido	AAZ	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Líquido	AAZ	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Líquido	AAZ	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Benzoato de fenilo	93-99-2	Sólido	AAZ	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Álcool cinamílico	104-54-1	Sólido	AAZ	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinilureia	39236-46-9	Sólido	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Metacrilato de metilo	80-62-6	Líquido	AAZ	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Clorobenzeno	108-90-7	Líquido	AAZ	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Isopropanol	67-63-0	Líquido	AAZ	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Número	Produto químico (1)	N.º CAS	Estado	Excipiente (2)	EC3 (%) (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Intervalo efetivo da EC3	Método LLNA versus ensaio em cobaias	Método LLNA versus sensibilização humana
16	Ácido láctico	50-21-5	Líquido	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Salicilato de metilo	119-36-8	Líquido	AAZ	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Ácido salicílico	69-72-7	Sólido	AAZ	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Substâncias facultativas para demonstração de melhor desempenho relativamente ao LLNA										
19	Laurilsulfato de sódio	151-21-3	Sólido	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Dimetacrilato de etilenoglicol	97-90-5	Líquido	MEK	28	1	14-56	NC	+/–	+/+
21	Xileno	1330-20-7	Líquido	AAZ	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/–
22	Cloreto de níquel	7718-54-9	Sólido	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Abreviaturas: AAZ = mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1; N.º CAS = Número de registo do *Chemical Abstracts Service*; DMF = *N*,*N*-dimetilformamida; DMSO = sulfóxido dimetílico; DNCB = 2,4--dinitroclorobenzeno; EC3 = estimativa da concentração necessária para gerar um índice de estimulação 3; Ensaio em cobaias = resultado do ensaio em cobaias (método B6 ou *Test Guideline* 406 da OCDE) (13); HCA = aldeído hexilcinâmico; LLNA = resultado do ensaio de gânglios linfáticos locais em ratos (método B.42 ou *Test Guideline* 429 da OCDE) (2); MEK = metiletilcetona; NA = não aplicável, visto o índice de estimulação ser inferior a 3; NC = não calculado, visto os dados provirem de um único estudo; Excipiente = excipiente utilizado no ensaio.

(*) Considerado não sensibilizante do ser humano, por não terem sido localizados resultados de ensaios clínicos de emplastros, por não figurar nas séries de alergénios para ensaios com emplastros e por não terem sido localizados casos registados de sensibilização de pessoas.

(**) Não estão disponíveis dados na cobaia.

(1) Os produtos químicos devem ser preparados diariamente, a menos que haja dados de estabilidade que demonstrem ser aceitável o seu armazenamento.

(2) Dados os efeitos potenciais dos diversos excipientes no desempenho do método LLNA, deve utilizar-se o excipiente recomendado para cada produto químico de referência (24) (32).

(3) Valor médio quando se dispõe de mais do que um valor de EC3. No caso das substâncias com resultado negativo (índice de estimulação < 3), indica-se a maior concentração ensaiada.

(4) Número de estudos pelo método LLNA de que provêm os dados.

(5) Disponível comercialmente sob a designação «Kathon CG» (n.º CAS 55965-84-9), que é uma mistura 3:1 de CMI e de MI. A concentração de cada componente varia de 1,1 % a 1,25 % (CMI) e de 0,3 % a 0,45 % (MI). Os componentes inativos são sais de magnésio (21,5 % a 24 %) e nitrato de cobre (0,15 % a 0,17 %), sendo o restante constituído por água (74 % a 77 %). O Kathon CG é fornecido pela Sigma-Aldrich e pela Rohm and Haas (agora Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Normas de fiabilidade e de exatidão**

7. A exatidão de um método LLNA similar ou modificado, avaliada com base na lista mínima prevista de 18 produtos químicos de referência, deve corresponder à das normas de desempenho de métodos LLNA, ou suplantá-la. O novo método ou o método modificado deve permitir uma decisão de classificação («sim» ou «não») correta. O novo método ou o método modificado pode, porém, não permitir classificar corretamente todos os produtos químicos de referência constantes da lista mínima. Se, por exemplo, a classificação atribuída a um dos sensibilizantes fracos for incorreta, poderá ponderar-se a demonstração de desempenho equivalente com base numa explicação da classificação incorreta e em dados suplementares adequados (por exemplo, resultados experimentais conducentes à classificação correta de outras substâncias, com propriedades físico-químicas e sensibilizantes similares às do produto químico de referência classificado incorretamente). Nessas circunstâncias, a validação de um método de ensaio LLNA similar ou modificado será apreciada caso a caso.

Reprodutibilidade intralaboratorial

8. Para determinar a reprodutibilidade intralaboratorial de um método de ensaio LLNA novo ou modificado, deve utilizar-se uma substância sensibilizante bem caracterizada pelo método LLNA. As normas de desempenho do método LLNA baseiam-se, para esse efeito, na variabilidade dos resultados de ensaios repetidos com aldeído hexilcinâmico. Para avaliar a fiabilidade intralaboratorial, devem obter-se estimativas de concentrações-limite (ECl) para o aldeído hexilcinâmico, em quatro ocasiões diferentes, com pelo menos uma semana de intervalo entre os ensaios. Considera-se a reprodutibilidade intralaboratorial aceitável se o laboratório for capaz de obter, em cada ensaio de aldeído hexilcinâmico, valores de ECl compreendidos entre 5 % e 20 %, correspondentes ao intervalo definido pela multiplicação por 0,5 e 2,0 da EC3 média especificada para o aldeído hexilcinâmico (10 %) no método LLNA (ver o quadro 1).

Reprodutibilidade interlaboratorial

9. Para determinar a reprodutibilidade interlaboratorial de um método de ensaio LLNA novo ou modificado, devem utilizar-se duas substâncias sensibilizantes bem caracterizadas pelo método LLNA. As normas de desempenho do método LLNA baseiam-se na variabilidade dos resultados de ensaios efetuados com aldeído hexilcinâmico e 2,4-dinitroclorobenzeno em laboratórios diferentes. Devem determinar-se valores de ECl a partir de um único estudo efetuado independentemente em, pelo menos, três laboratórios distintos. Para que fique demonstrada uma reprodutibilidade interlaboratorial aceitável, cada laboratório deve obter valores de ECl compreendidos entre 5 % e 20 %, para o aldeído hexilcinâmico, e entre 0,025 % e 0,1 %, para o 2,4-dinitroclorobenzeno, que correspondem ao intervalo definido, respetivamente, pela multiplicação por 0,5 e 2,0 das concentrações EC3 médias especificadas para o aldeído hexilcinâmico (10 %) e para o 2,4-dinitroclorobenzeno (0,05 %) no método LLNA (ver o quadro 1).

▼M3

Apêndice 2

Definições

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (14).

Substância de referência: Substância (sensibilizante ou não) utilizada como termo de comparação com a substância em estudo. Deve ter as seguintes propriedades: i) origem ou origens uniformes e fiáveis; ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo; iii) características físico-químicas conhecidas; iv) disponibilidade de dados sobre os efeitos conhecidos; e v) potência conhecida situada na gama de reação pretendida.

Estimativa de concentração estabelecida como limite (ECl): Concentração de uma substância em estudo que se estima necessária para gerar um índice de estimulação indicativo de resposta positiva.

Estimativa de concentração «índice 3» (EC3): Concentração de uma substância em estudo que se estima necessária para gerar um índice de estimulação 3.

Falso negativo: Substância em estudo incorretamente considerada negativa ou inativa pelo método de ensaio, quando na realidade é positiva ou ativa.

Falso positivo: Substância em estudo incorretamente considerada positiva ou ativa pelo método de ensaio, quando na realidade é negativa ou inativa.

Perigo: Potencial de efeitos adversos na saúde ou no ambiente que só se manifestam se o grau de exposição for suficiente.

Reprodutibilidade interlaboratorial: Medida do grau em que laboratórios qualificados diferentes, utilizando o mesmo protocolo para ensaiar a mesma substância em estudo, conseguem obter resultados qualitativa e quantitativamente similares. Determina-se durante os processos de pré-validação e de validação. Indica em que medida um ensaio pode ser transferido com êxito para outro laboratório e também é designada por «reprodutibilidade entre laboratórios» (14).

Reprodutibilidade intralaboratorial: Medida do grau em que pessoal qualificado do mesmo laboratório nele consegue repetir resultados com êxito, em momentos diferentes, utilizando o mesmo protocolo. Também se designa por «reprodutibilidade no laboratório» (14).

Ensaio «me-too»: Expressão coloquial em inglês que designa um método de ensaio estrutural e funcionalmente similar a um método de referência validado e aceite. Um método com estas características é candidato a validação por similitude. O termo é sinónimo de «método de ensaio similar» (14).

Ponto aberrante: Observação que difere marcadamente dos outros valores de uma amostra aleatória de uma população.

▼M3

Normas de desempenho: Normas associadas a um método de ensaio validado com base nas quais pode ser avaliada a comparabilidade de um método de ensaio proposto que lhe seja funcional e mecanisticamente similar. Integram essas normas: i) os componentes essenciais do método de ensaio, ii) uma lista mínima de produtos químicos de referência, selecionados entre os produtos químicos utilizados para demonstrar a aceitabilidade do desempenho do método de ensaio validado, e iii) os níveis de exatidão e de fiabilidade, comparáveis aos obtidos com o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve evidenciar ao ser avaliado utilizando a lista mínima de produtos químicos de referência (14).

Método de ensaio sujeito a direitos de propriedade: Método de ensaio cujas manufatura e distribuição são abrangidas por patentes, direitos de autor, marcas comerciais, etc.

Garantia de qualidade: Processo de gestão no âmbito do qual a observância das normas de ensaio, das exigências e dos procedimentos de conservação de registos laboratoriais, bem como a exatidão dos dados transferidos, são avaliadas por pessoas independentes das que efetuam os ensaios.

Produtos químicos de referência: Produtos químicos selecionados para serem utilizados no processo de validação, cujas respostas aos sistemas de ensaio de referência *in vitro* ou *in vivo*, ou na espécie em causa, já são conhecidas. Estes produtos químicos devem ser representativos das classes de produtos químicos para as quais está prevista a utilização do método de ensaio e devem traduzir toda a gama de respostas (forte, fraca, negativa) que são de esperar dos produtos químicos aos quais o método se destina. Fases diferentes do processo de validação, métodos de ensaio diferentes e utilizações diferentes do mesmo ensaio podem exigir séries diferentes de produtos químicos de referência (14).

Adequação: Relação do ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (14).

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (14).

Sensibilização cutânea: Processo imunológico que se manifesta quando um indivíduo sensível é exposto, por via tópica, a um alergénio químico indutor de uma resposta imunológica cutânea passível de gerar sensibilização por contacto.

Índice de estimulação (IE): Valor calculado para quantificar o potencial de sensibilização cutânea das substâncias estudadas; corresponde à razão entre a proliferação nos grupos tratados e a proliferação no grupo de controlo do excipiente ensaiado em paralelo.

Substância em estudo (ou produto químico em estudo): Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Método de ensaio validado: Método de ensaio relativamente ao qual foram concluídos estudos de validação com vista a determinar a sua adequação (incluída a exatidão) e fiabilidade para um determinado fim. É importante referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exato e fiável para ser considerado aceitável para o fim pretendido (14).

▼B

B.43. **ESTUDO DE NEUROTOXICIDADE EM ROEDORES**

1. **MÉTODO**

O presente método é equivalente ao «Test Guideline» TG 424 da OCDE (1997).

O presente Método de Ensaio foi concebido para obter a informação necessária para confirmar ou conseguir uma melhor caracterização da potencial neurotoxicidade de substâncias químicas em animais adultos. Pode ser combinado com Métodos de Ensaio para estudos de toxicidade de dose repetida ou efectuado como um estudo independente. Recomenda-se a consulta do Documento de Orientação da OCDE sobre Estratégias e Métodos de Ensaios de Neurotoxicidade (1) para a concepção dos estudos baseados no presente Método de Ensaio. Este facto é particularmente importante no caso de se considerarem alterações das observações ou dos procedimentos de ensaio recomendados para uso rotineiro do presente método. O Documento de Orientação foi preparado para facilitar a selecção de outros procedimentos de ensaio para uso em circunstâncias específicas.

A avaliação de neurotoxicidade em relação ao desenvolvimento não é abrangida pelo presente método.

1.1. INTRODUÇÃO

Na avaliação das características tóxicas das substâncias químicas, é importante considerar o potencial de efeitos neurotóxicos. O Método de Ensaio para toxicidade sistémica de dose repetida inclui observações conducentes ao rastreio de neurotoxicidade potencial. O presente Método de Ensaio pode ser utilizado na concepção de um estudo para obtenção de informação suplementar ou para confirmação dos efeitos observados nos estudos de toxicidade sistémica de dose repetida. No entanto, uma ponderação da neurotoxicidade potencial de certo tipo de substâncias químicas pode ser indicativa de esta ser avaliada mais apropriadamente utilizando o presente método, mesmo na ausência de indicações prévias de existência de neurotoxicidade potencial provenientes de estudos de toxicidade sistémica de dose repetida. Tal ponderação pode incluir, por exemplo:

— observação dos sinais neurológicos ou lesões neuropatológicas em estudos de toxicidade diferentes dos estudos de toxicidade sistémica de dose repetida, ou

— relação estrutural ou outra informação que estabeleça uma ligação com outros neurotóxicos conhecidos.

Além disso, podem existir outras circunstâncias para as quais é apropriada a utilização do presente Método de Ensaio. Para informação detalhada, consultar a referência (1).

O presente método foi desenvolvido de modo a poder ser adaptado às necessidades específicas para a confirmação da neurotoxicidade histopatológica e comportamental de uma substância química, bem como a permitir uma caracterização e quantificação das respostas neurotóxicas.

▼B

No passado, a neurotoxicidade foi identificada como neuropatia envolvendo lesões neuropatológicas ou anomalias neurológicas, tais como convulsão, paralisia ou tremores. Apesar da neuropatia ser uma importante manifestação de neurotoxicidade, é actualmente claro que existem muitos outros sinais de toxicidade no sistema nervoso (por exemplo, perda de coordenação motora, deficiências sensoriais, disfunções da aprendizagem e da memória) que podem não se reflectir em neuropatia ou noutro tipo de estudos.

O presente Método de Ensaio de neurotoxicidade foi concebido para detectar os principais efeitos neurocomportamentais e neuropatológicos em roedores adultos. Apesar de os efeitos comportamentais, mesmo na ausência de alterações morfológicas, poderem reflectir um impacto nefasto no organismo, nem todas as alterações comportamentais são específicas do sistema nervoso. Assim, quaisquer alterações observadas devem ser avaliadas em conjunto com os dados histopatológicos, hematológicos ou bioquímicos relacionados, bem como com dados provenientes de outros tipos de toxicidade sistémica. O ensaio utilizado, no presente método, para fornecer uma caracterização e quantificação das respostas neurotóxicas inclui procedimentos histopatológicos e comportamentais específicos que podem ser confirmados por investigações electrofisiológicas e/ou bioquímicas (1) (2) (3) (4).

Os neurotóxicos podem actuar sobre o sistema nervoso em vários alvos e por diversos mecanismos. Dado que não é possível utilizar uma única série de ensaios para avaliar completamente o potencial neurotóxico de todas as substâncias, pode ser necessário utilizar outros ensaios *in vivo* ou *in vitro* específicos para o tipo de neurotoxicidade observada ou prevista.

O presente Método de Ensaio, pode também ser utilizado em conjunto com as orientações estabelecidas pelo Documento de Orientação da OCDE sobre Estratégias e Métodos de Ensaios de Neurotoxicidade (1), para a concepção de estudos destinados a uma caracterização suplementar ou um aumento da sensibilidade da quantificação da curva dose-efeito, de modo a obter uma melhor estimativa do nível sem efeito adverso observável ou a confirmar a perigosidade conhecida ou prevista de uma substância química. Por exemplo, os estudos podem ser concebidos para identificar e avaliar o(s) mecanismo(s) neurotóxico(s) ou para obter informação suplementar sobre dados previamente disponíveis a partir do uso de procedimentos de observação neurocomportamental e neuropatológica básicos. Tais estudos necessitam de dados não replicados que seriam obtidos pelo uso dos procedimentos padronizados recomendados no presente método, caso esses dados não se encontrem já disponíveis e não sejam considerados necessários para a interpretação dos resultados do estudo.

O presente estudo de neurotoxicidade, quer utilizado independentemente, quer em conjunto com outros métodos, permite obter informação para:

— identificar se o sistema nervoso central é afectado permanente ou reversivelmente pela substância química ensaiada;

— contribuir para a caracterização das alterações do sistema nervoso central associadas à exposição à substância química e para a compreensão do mecanismo subjacente;

▼B

— determinar as curvas dose-efeito e tempo-efeito, de modo a obter uma estimativa do nível sem efeito adverso observável (que pode ser utilizado para estabelecer critérios de segurança para a substância química).

O presente método utiliza a administração oral da substância de ensaio. Podem ser mais apropriadas outras vias de administração (por exemplo, dérmica ou por inalação), pelo que podem ser necessárias modificações dos procedimentos recomendados. A selecção ponderada, da via de administração, depende do perfil de exposição humana e da informação toxicológica e cinética disponível.

1.2. DEFINIÇÕES

Efeito adverso: qualquer alteração à normalidade relacionada com o tratamento que diminua a capacidade de um organismo para sobreviver, reproduzir-se ou adaptar-se ao meio ambiente.

Dose: quantidade aplicada da substância de ensaio. O valor da dose é expresso em peso (g, mg) de substância de ensaio por unidade de peso de animal de ensaio (por exemplo, mg/kg) ou em concentrações dietéticas constantes (ppm).

Dosagem: termo geral que inclui a dose, a sua frequência e a duração da aplicação da dose.

Neurotoxicidade: alteração adversa na estrutura ou função do sistema nervoso que resulta da exposição a um agente químico, biológico ou físico.

Neurotóxico: agente químico, biológico ou físico que apresenta potencial para causar neurotoxicidade.

NSEAO: abreviatura para nível sem efeito adverso observável; corresponde à maior dose ou ao maior nível de exposição para o qual não se observam efeitos adversos relacionados com o tratamento.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância química de ensaio é administrada por via oral ao longo de uma gama de doses a vários grupos de roedores de laboratório. São normalmente necessárias doses repetidas e o regime de dosagem pode ser de 28 dias, subcrónico (90 dias) ou crónico (1 ano ou mais). Os procedimentos estabelecidos no presente Método de Ensaio podem também ser usados para um estudo de neurotoxicidade aguda. Os animais são ensaiados de modo a permitir a detecção ou a caracterização de anomalias comportamentais e/ou neurológicas. Durante cada período de observação é avaliada uma gama de comportamentos que podem ser afectados por neurotóxicos. No final do ensaio, um subconjunto de animais de cada sexo e de cada grupo é submetido a perfusão *in situ* e são preparadas e examinadas secções do cérebro, medula espinal e nervos periféricos.

No caso do estudo ser efectuado independentemente para rastreio de neurotoxicidade ou caracterização dos efeitos neurotóxicos, os animais de cada grupo que não são utilizados para perfusão e histopatologia subsequente (consultar tabela 1) podem ser utilizados em procedimentos neurocomportamentais, neuropatológicos, neuroquímicos e electrofisiológicos específicos que podem complementar os dados obtidos nos exames padronizados necessários ao presente método (1). Estes procedimentos suplementares podem ser particularmente úteis nos casos em que as observações empíricas ou os efeitos previstos revelam um tipo ou alvo específicos de neurotoxicidade de determinado agente químico. Alternativamente, os restantes animais podem ser utilizados em avaliações, tais como as necessárias aos Métodos de Ensaio para estudos de dose repetida em roedores.

▼B

No caso de se combinarem os procedimentos do presente Método de Ensaio, com os de outros Métodos de Ensaio, é necessário um número suficiente de animais para satisfazer as necessidades de observações de ambos os estudos.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Selecção de espécies animais**

A espécie preferida de roedores para ensaio é o rato, mas, caso seja apresentada uma justificação, podem ser utilizadas outras espécies de roedores. Devem ser utilizadas estirpes laboratoriais de uso corrente e animais adultos, jovens e saudáveis. As fêmeas devem ser nulíparas e não devem estar grávidas. A aplicação da dose deve começar o mais rapidamente possível após o desmame, preferencialmente com animais que não tenham completado ainda seis semanas e sempre com animais com menos de nove semanas. No entanto, nos casos em que o estudo é combinado com outros estudos, pode ser necessário ajustar este requisito de idade. No início do estudo a diferença de peso entre os animais deverá ser mínima, não podendo ultrapassar 20 % do peso médio de cada sexo. No caso de se efectuar um estudo de dose repetida de curta duração, como estudo preliminar do estudo de longo prazo, os animais utilizados em ambos os estudos devem ser da mesma estirpe e da mesma proveniência.

1.4.2. **Condições de alojamento e alimentação**

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser de 22 ºC (± 3 ºC). A humidade relativa deverá ser 50 %-60 %, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30 % e um máximo que, de preferência, não deverá exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Os ruídos intensos intermitentes devem ser minimizados. A alimentação pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber. Quando a substância de ensaio for administrada pela alimentação, a escolha da dieta poderá ser condicionada pela necessidade de assegurar a dosagem adequada. Os animais podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo.

1.4.3. **Preparação dos animais**

Os animais jovens e saudáveis são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de tratamento e de controlo. As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Os animais são marcados de modo a permitir uma identificação individualizada e mantidos nas suas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início da administração das doses, de modo a permitir que se aclimatem às condições laboratoriais.

1.4.4. **Via de administração e preparação das doses**

O presente Método de Ensaio aborda especificamente a administração oral da substância de ensaio. A forma de administração pode ser por sonda esofágica, através da alimentação ou da água de beber ou por cápsulas. Podem ser mais apropriadas outras vias de administração (por exemplo, dérmica ou por inalação), pelo que podem ser necessárias modificações dos procedimentos recomendados. A selecção ponderada da via de administração depende do perfil de exposição humana e da informação toxicológica e cinética disponível. Devem ser apresentadas uma justificação para a selecção da via de administração, bem como as modificações dos procedimentos do Método de Ensaio daí resultantes.

▼B

Se for necessário, a substância de ensaio pode ser dissolvida ou suspensa num excipiente apropriado. Recomenda-se que, sempre que possível, seja considerada em primeiro lugar a utilização de uma solução/suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode considerar-se o uso de uma solução/suspensão em óleo (por exemplo, óleo de milho); em último caso, poderá eventualmente recorrer-se ao uso de soluções/suspensões noutros excipientes. Devem conhecer-se as características tóxicas dos excipientes. Deverão ser tomadas em consideração as seguintes características do excipiente: efeitos na absorção, distribuição, metabolismo ou retenção da substância de ensaio, que possam modificar as suas características tóxicas e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais.

1.5. PROCEDIMENTOS

1.5.1. **Número e sexo dos animais**

No caso de o estudo ser efectuado independentemente, devem ser utilizados pelo menos 20 animais (10 fêmeas e 10 machos) em cada grupo de dose e de controlo para a avaliação das observações clínicas e funcionais detalhadas. Pelo menos cinco machos e cinco fêmeas, seleccionados dos grupos de 10 machos e 10 fêmeas, devem ser sujeitos a perfusão e utilizados para neuro-histopatologia detalhada no final do estudo. Nos casos em que apenas é observado um número limitado de animais, num determinado grupo de dose, para detecção de efeitos neurotóxicos, deve considerar-se a inclusão destes animais no grupo seleccionado para perfusão. No caso de o estudo ser efectuado em conjunto com um estudo de toxicidade de dose repetida, deve ser utilizado um número de animais adequado de modo a cumprir os objectivos de ambos os estudos. Na tabela 1 apresentam-se os números mínimos de animais por grupo para vários estudos combinados. No caso de se planearem grupos de mortes intermédias ou de recuperação para observação da reversibilidade, persistência ou ocorrência retardada de efeitos tóxicos pós-tratamento ou quando são consideradas observações suplementares, o número de animais deve ser aumentado de modo a assegurar que se encontra disponível o número de animais necessário para observação e histopatologia.

1.5.2. **Grupos de ensaio e de controlo**

Em geral devem ser utilizados pelo menos três grupos de dose e um grupo de controlo, mas se pela avaliação de outros dados não forem previstos quaisquer efeitos a uma dose repetida de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia pode ser efectuado um teste-limite. Caso não se encontrem disponíveis dados adequados, pode ser efectuado um estudo preliminar de avaliação da gama, de modo a permitir a determinação das doses a utilizar. Os animais do grupo de controlo devem ser tratados da mesma maneira que os animais dos grupos de ensaio, com excepção do tratamento com a substância de ensaio. Caso seja utilizado um excipiente, o grupo de controlo deverá receber o volume máximo de excipiente utilizado no ensaio.

1.5.3. **Teste de fiabilidade**

O laboratório que efectua o estudo deve apresentar dados comprovativos da sua capacidade para efectuar o estudo e relativos à sensibilidade dos procedimentos utilizados. Tais dados devem provar a capacidade de detectar e quantificar, como apropriadas, alterações nos diferentes critérios específicos recomendados para observação, tais como sinais autonómicos, reactividade sensorial, força de preensão dos membros e actividade motora. Podem ser consultadas as referências 2 a 9 para informações sobre substâncias químicas que provocam diferentes respostas neurotóxicas e que podem ser utilizadas como controlos positivos. Podem ser utilizados dados históricos desde que os procedimentos experimentais não sejam alterados. Recomenda-se uma actualização periódica dos dados históricos. Caso o laboratório executante modifique alguns elementos essenciais da execução do ensaio ou procedimentos, devem obter-se novos dados comprovativos de que a sensibilidade dos procedimentos não foi alterada.

▼B

1.5.4. **Selecção da dose**

A escolha dos níveis de dose deverá tomar em consideração todos os dados de toxicidade e cinética existentes para a substância de ensaio ou as substâncias relacionadas. Deve ser seleccionado o nível de dose mais elevado que induza efeitos neurotóxicos ou efeitos tóxicos sistémicos evidentes. Deve seleccionar-se uma sequência descendente de níveis de dose que permita detectar qualquer resposta relacionada com a dose e determinar o nível sem efeito adverso observável (NSEAO) ao nível de dose mais baixo. Em princípio, os níveis de dose devem ser estabelecidos de modo a permitir distinguir entre os efeitos tóxicos primários no sistema nervoso e os efeitos relacionados com toxicidade sistémica. Em muitos casos, a melhor forma de estabelecer estas sequências consiste no espaçamento das doses em dois a três intervalos. A adição de um quarto grupo de ensaio é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes entre as dosagens (ou seja, com um factor superior a 10). Nos casos em que existe uma estimativa razoável da exposição humana, esta deve também ser tomada em consideração.

1.5.5. **Teste-limite**

Se um ensaio com um nível de dose oral de pelo menos 1 000 mg/kg de peso corporal/dia, realizado de acordo com os procedimentos descritos neste estudo, não provocar efeitos neurotóxicos observáveis e se, além disso, os dados existentes sobre compostos estruturalmente relacionados com a substância de ensaio não sugerirem a possível ocorrência de toxicidade, poderá considerar-se desnecessário realizar um ensaio completo com três níveis de dose. Nos casos em que se preveja exposição humana poderá ser necessário aumentar o nível de dose oral no ensaio-limite. Quando se usam outras formas de administração, como inalação ou aplicação cutânea, as propriedades físico-químicas da substância de ensaio são muitas vezes indicativas e limitativas do nível máximo de exposição praticável. Para a execução do estudo oral agudo, a dose para o teste-limite deve ser, no mínimo, de 2 000 mg/kg.

1.5.6. **Administração de doses**

A aplicação da dose da substância de ensaio nos animais é efectuada diariamente, sete dias por semana, durante um período de pelo menos 28 dias. O uso de um período de dosagem de cinco dias ou inferior deve ser justificado. A administração por sonda esofágica deve ser feita, de preferência, numa toma única, usando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação apropriada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal de ensaio. O volume não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal. Para soluções aquosas, contudo, pode ser considerada a dose de 2 ml/100 g de peso corporal. Deve minimizar-se a variabilidade do volume de ensaio efectuando ajustes nas concentrações, de forma a assegurar a constância do volume em todos os níveis de dose; exceptuam-se os casos em que se utilizam substâncias irritantes ou corrosivas, que normalmente exercem efeitos exacerbados quando aplicadas em concentrações mais elevadas.

É importante assegurar que as quantidades da substância de ensaio administradas através da alimentação ou da água de beber não interferem nas exigências normais de nutrição ou de consumo de água. Quando a substância de ensaio for incorporada na alimentação pode utilizar-se uma concentração alimentar constante (ppm) ou, alternativamente, um nível de dose constante em relação ao peso corporal dos animais; deve especificar-se o método escolhido para o ensaio. No caso de uma substância administrada por sonda esofágica, a dose deve ser administrada todos os dias à mesma hora, devendo ser ajustada pelo menos uma vez por semana a fim de se manter uma dose constante em relação ao peso corporal do animal. No caso de se efectuar um estudo de dose repetida, como estudo preliminar de um estudo de longo prazo, deve utilizar-se uma dieta semelhante em ambos os estudos. Nos estudos de toxicidade aguda, se não for possível a administração de uma toma única, a dose pode ser administrada em fracções menores ao longo de um período não superior a 24 horas.

▼B

1.6. OBSERVAÇÕES

1.6.1. **Frequência das observações e ensaios**

Nos estudos de dose repetida, o período de observação deve abranger o período de dosagem. Nos estudos de toxicidade aguda deve ser observado um período de 14 dias após o tratamento. As observações devem também abranger este período para os animais em grupos-satélite que foram mantidos sem exposição durante o período após o tratamento.

As observações devem ser efectuadas com uma frequência suficiente para maximizar a probabilidade de detecção de qualquer anomalia comportamental e/ou neurológica. As observações devem ser, preferencialmente, efectuadas à mesma hora, todos os dias, tendo em conta o período de pico previsto de efeitos após aplicação da dose. Na tabela 2 apresenta-se resumida a frequência das observações clínicas, bem como dos ensaios funcionais. No caso de existirem dados cinéticos ou outros dados obtidos em estudos prévios indicativos da necessidade de se utilizarem diferentes momentos de observação, ensaios ou períodos de observação posteriores, deve adoptar-se um calendário alternativo de modo a obter o máximo de informação. Deve apresentar-se uma justificação para as alterações introduzidas no calendário.

1.6.1.1. *Observações do estado de saúde geral e da mortalidade/morbilidade*

Todos os animais devem ser observados cuidadosamente, pelo menos uma vez por dia, para avaliar o seu estado de saúde geral, bem como, pelo menos duas vezes por dia, para avaliar a mortalidade e morbilidade.

1.6.1.2. *Observações clínicas pormenorizadas*

Devem ser efectuadas observações clínicas pormenorizadas em todos os animais seleccionados para este fim (consultar a tabela 1), uma vez antes da primeira exposição (de modo a permitir a comparação entre os diferentes animais) e, posteriormente, a diferentes intervalos, consoante a duração do estudo (consultar a tabela 2). Devem ser também efectuadas observações clínicas pormenorizadas nos grupos-satélite de recuperação no final do período de recuperação. As observações clínicas pormenorizadas devem ser efectuadas no exterior do compartimento experimental, numa arena-padrão. Devem ser registadas cuidadosamente utilizando sistemas de pontuação que incluam escalas de critérios ou de pontuação para cada medição das observações. Os critérios ou escalas utilizados devem ser explicitamente definidos pelo laboratório de ensaio. Deve assegurar-se que as variações das condições de ensaio são mínimas (não sistematicamente relacionadas com o tratamento) e que as observações são efectuadas por pessoal especializado sem conhecimento do tratamento efectuado.

Recomenda-se que as observações sejam efectuadas de um modo estruturado, em que se aplicam sistematicamente critérios bem definidos (incluindo a definição de «gama» normal) a cada animal, em cada observação. A «gama normal» deve ser apropriadamente documentada. Devem ser registados todos os sinais observados. Sempre que possível, deve também ser registada a intensidade dos sinais observados. As observações clínicas devem incluir, entre outros aspectos, alterações na pele, pêlo, olhos, membranas mucosas, ocorrência de secreções e excreções e actividade autónoma (por exemplo, lacrimação, erecção pilosa, tamanho da pupila, padrão respiratório anormal e/ou respiração pela boca, quaisquer sinais pouco usuais de urina ou defecação e urina descorada).

▼B

Devem ser registadas quaisquer respostas pouco usuais relativas à posição corporal, nível de actividade (por exemplo, maior ou menor exploração da arena-padrão) e coordenação dos movimentos. Também devem ser registadas alterações na marcha (por exemplo, marcha bamboleante, ataxia), postura (por exemplo, dorso arqueado) e reactividade ao manuseamento, colocação ou outros estímulos ambientais, bem como a presença de movimentos clónicos ou tónicos, convulsões ou tremores, estereótipos (por exemplo, higiene excessiva, movimentos de cabeça pouco usuais, locomoção em círculos repetitiva) ou comportamento anómalo (por exemplo, morder ou lamber excessivamente, automutilação, andar para trás, vocalização) ou agressão.

1.6.1.3. *Ensaios funcionais*

Tal como para o caso das observações clínicas pormenorizadas, devem ser efectuados ensaios funcionais uma vez antes da exposição e frequentemente após a exposição nos animais seleccionados para este fim (consultar a tabela 1). A frequência dos ensaios funcionais depende também da duração do estudo (consultar a tabela 2). Além dos períodos de observação, estabelecidos na tabela 2, as observações funcionais dos grupos-satélite de recuperação devem também ser efectuadas o mais próximo possível da morte terminal. Os ensaios funcionais devem incluir a reactividade sensorial a estímulos de várias tipos [por exemplo, estímulos auditivos, visuais e proprioceptivos (5) (6) (7)], a avaliação da força de preensão dos membros (8) e a avaliação da actividade motora (9). A actividade motora deve ser medida com um dispositivo automático capaz de detectar tanto aumentos como diminuições de actividade. Caso seja utilizado outro sistema definido, este deve ser quantitativo e a sua sensibilidade e fiabilidade devem ser comprovadas. Cada dispositivo deve ser ensaiado para assegurar a fiabilidade ao longo do tempo e a consistência entre os diferentes dispositivos. Nas respectivas referências apresenta-se informação detalhada sobre os procedimentos a seguir. Caso não existam quaisquer dados (por exemplo, relações estrutura-actividade, dados epidemiológicos, outros estudos toxicológicos) indicativos dos potenciais efeitos neurológicos, deve ser considerada a inclusão de ensaios mais especializados de função sensorial e motora ou de aprendizagem e memória de modo a que estes possíveis efeitos sejam examinados mais pormenorizadamente. Na referência (1) apresentam-se informações adicionais sobre os ensaios especializados e sua utilização.

Excepcionalmente, os animais que apresentem sinais de toxicidade numa extensão que afecte significativamente o ensaio funcional podem ser excluídos deste ensaio. Deve ser apresentada uma justificação para a exclusão de animais do ensaio funcional.

1.6.2. **Peso corporal e consumo de alimento/água**

Para estudos com duração até 90 dias, todos os animais devem ser pesados, pelo menos, uma vez por semana, e devem ser feitas medições do consumo de alimentos (consumo de água, caso a substância de ensaio seja administrada por este meio) pelo menos semanalmente. Para estudos de longo prazo, todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana durante as 13 primeiras semanas e seguidamente pelo menos de 4 em 4 semanas. Devem ser feitas medições do consumo de alimentos (consumo de água, caso a substância de ensaio seja administrada por este meio), pelo menos semanalmente, nas primeiras 13 semanas, e seguidamente com um intervalo de cerca de três meses, excepto se o estado de saúde ou as variações de peso corporal indicarem que se deve fazer com outra periodicidade.

▼B

1.6.3. **Oftalmologia**

Para estudos de duração superior a 28 dias deve ser efectuado um exame oftalmológico, utilizando um oftalmoscópio ou um instrumento equivalente adequado, antes da administração da substância de ensaio e no final do estudo. Preferencialmente este exame deve ser feito a todos os animais ou, pelo menos, aos animais dos grupos de doses elevadas e dos grupos de controlo. Todos os animais devem ser examinados caso sejam detectadas alterações oculares ou caso os sintomas clínicos assim o indiquem. Para estudos de longo prazo, o exame oftalmológico deve também ser efectuado no final de 13 semanas. Não é necessário efectuar os exames oftalmológicos se existirem dados disponíveis de outros estudos com duração semelhante e com níveis de dose semelhantes.

1.6.4. **Hemograma e química clínica**

Se o estudo de neurotoxicidade for efectuado em conjunto com um estudo de toxicidade sistémica de dose repetida, devem ser efectuadas análises clínicas (hemograma e química clínica), tal como estabelecido no respectivo método do estudo de toxicidade sistémica. A recolha das amostras deve ser efectuada de modo a minimizar quaisquer potenciais efeitos no comportamento neuronal.

1.6.5. **Histopatologia**

O exame neuropatológico deve ser concebido a fim de complementar e aprofundar as observações efectuadas durante a fase *in vivo* do estudo. Os tecidos provenientes de, pelo menos, cinco animais de cada grupo do mesmo sexo (consultar a tabela 1 e o parágrafo seguinte) devem ser fixados *in situ* por utilização de técnicas de perfusão e fixação comummente adoptadas (consultar a referência 3, capítulo 5, e a referência 4, capítulo 50). Devem ser registadas quaisquer alterações importantes que sejam observadas. No caso de o estudo ser efectuado independentemente para rastreio de neurotoxicidade ou para caracterizar efeitos neurotóxicos, os animais que não sejam utilizados podem sê-lo em procedimentos neurocomportamentais (10) (11), neuropatológicos (10) (11) (12) (13), neuroquímicos (10) (11) (14) (15) e electrofisiológicos específicos que podem complementar os procedimentos e exames descritos ou podem ser acrescentados aos animais sujeitos a exame histopatológico. Estes procedimentos complementares têm um interesse especial quando as observações empíricas ou os efeitos previstos são indicativos de um tipo ou alvo específicos para a neurotoxicidade (2) (3). Os animais não utilizados podem, alternativamente, sê-lo em avaliações patológicas de rotina tal como descritas no método para estudos de dose repetida.

Deve ser utilizada uma técnica de coloração convencional, tal como hematoxilina ou eosina (H&E), em todas as amostras de tecidos, que devem ser fixadas em parafina e examinadas ao microscópio. Caso sejam observados sintomas de neuropatia periférica ou haja suspeitas nesse sentido, devem ser examinadas amostras de tecido nervoso periférico fixado em plástico. Os sintomas clínicos podem igualmente sugerir o exame a locais adicionais ou a utilização de técnicas de coloração especiais. Podem obter-se orientações sobre os locais adicionais a examinar em (3) e (4). Pode também ser útil a utilização de técnicas de coloração especiais apropriadas à demonstração de alterações patológicas específicas (18).

▼B

Os segmentos representativos dos sistemas nervosos central e periférico devem ser sujeitos a exame histopatológico (consultar a referência 3, capítulo 5, e a referência 4, capítulo 50). As áreas a examinar devem normalmente incluir: o cérebro anterior, o centro do cérebro, incluindo uma secção através do hipocampo, o mesencéfalo, o cerebelo, a ponte de Varolio, a *medulla oblongata*, o olho, incluindo o nervo óptico e a retina, a espinal medula ao nível das protuberâncias cervical e lombar, os gânglios da raiz dorsal, as fibras das raízes dorsal e ventral, o nervo ciático proximal, o nervo tibial proximal (no joelho) e as ramificações do nervo tibial nos gémeos. Devem ser examinadas as secções coronal, transversal e longitudinal da espinal medula e dos nervos periféricos. Deve ser dada especial atenção à vasculatura do sistema nervoso. Deve ser igualmente analisada uma amostra de músculo esquelético, nomeadamente, gémeos. Deve ser prestada especial atenção aos locais com estrutura e padrão celular e fibroso bi SNC e SNP que se saiba serem particularmente vulneráveis a substâncias neurotóxicas.

Podem obter-se orientações sobre as alterações neuropatológicas que resultam tipicamente da exposição a substâncias tóxicas nas referências (3) e (4). Recomenda-se um exame minucioso das amostras de tecidos, no qual são inicialmente comparados os cortes seccionais obtidos no grupo de dose mais elevada com os obtidos no grupo de controlo. Caso não sejam observadas quaisquer alterações neuropatológicas nas amostras provenientes desses grupos, não é necessário efectuar quaisquer análises subsequentes. Caso sejam observadas alterações neuropatológicas no grupo de dose mais elevada, as amostras de cada um dos tecidos potencialmente afectados provenientes dos grupos de doses intermédia e reduzida devem ser codificadas e analisadas sequencialmente.

Caso sejam detectados, no decorrer do exame qualitativo, quaisquer sintomas de alterações neuropatológicas, deve ser efectuado um segundo exame a todas as regiões do sistema nervoso que apresentem tais alterações. Cortes seccionais provenientes de todos os grupos de dosagem de cada uma das regiões potencialmente afectadas devem ser codificados e examinados ao acaso, sem conhecimento do respectivo código. Devem ser registadas a frequência e gravidade de cada lesão detectada. Após a classificação de todas as regiões em todos os grupos de dosagem, o código pode ser revelado e pode ser efectuada a análise estatística de modo a avaliar as relações dose-efeito. Devem descrever-se exemplos para os diferentes graus de gravidade das várias lesões.

Os dados neuropatológicas devem ser avaliados no contexto das observações comportamentais e das medidas efectuadas, assim como de quaisquer outros dados provenientes de estudos de toxicidade sistémica da substância de ensaio efectuados anterior ou simultaneamente.

2. DADOS

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Devem apresentar-se os dados individuais. Além disso, todos os dados devem ser resumidos em forma tabular, indicando, para cada grupo de ensaio ou de controlo, o número de animais no início do ensaio, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou sacrificados a fim de evitar dor, o momento de todas as mortes (espontâneas ou provocadas), o número de animais apresentando sintomas de toxicidade, uma descrição dos sintomas de toxicidade observados (incluindo o momento do aparecimento, a duração, o tipo e a gravidade), o número de animais que apresentam lesões, incluindo o tipo e a gravidade de tais lesões.

▼B

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados do estudo devem ser avaliados em termos da incidência, gravidade e correlação entre os efeitos observados aos níveis neurocomportamental e neuropatológico (assim como os efeitos neuroquímicos e electrofisiológicos, caso sejam efectuados quaisquer exames complementares) e quaisquer outros efeitos adversos observados. Sempre que possível, os resultados numéricos devem ser avaliados através de um método estatístico adequado e de utilização comum. Os métodos estatísticos devem ser determinados durante o planeamento do estudo.

3. **RELATÓRIO**

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Substância de ensaio:

— natureza física (incluindo isómeros, pureza e propriedades físico-químicas);

— dados de identificação.

Excipiente (se apropriado):

— justificação para escolha do excipiente.

Animais de ensaio:

— espécie/estirpe usada;

— número, idade e sexo dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, aclimatização, dieta, etc.;

— peso individual dos animais no início do ensaio.

Condições do ensaio:

— informação pormenorizada sobre a formulação da substância de ensaio/preparação da dieta, concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação;

— especificação das doses administradas, incluindo dados pormenorizados sobre o excipiente, volume e forma física do material administrado;

— informação pormenorizada sobre a administração da substância de ensaio;

— justificações para a escolha dos diferentes níveis de dosagem;

— justificações para a escolha da via de administração e a duração do ensaio;

— conversão da concentração da substância de ensaio na dieta/água de beber (ppm) para a dose real (mg/kg de peso corporal/dia), se aplicável;

— informação pormenorizada sobre a qualidade dos alimentos e da água.

Observações e procedimentos de ensaio:

— informação pormenorizada sobre a atribuição dos animais de cada grupo aos diferentes subgrupos de perfusão;

— informação pormenorizada sobre os sistemas de classificação, incluindo escalas de classificação e critérios para cada medida efectuada nas observações clínicas aprofundadas;

▼B

— informação pormenorizada sobre os ensaios funcionais da reacção sensorial aos estímulos de diferentes origens (por exemplo, auditivos, visuais e proprioceptivos); da avaliação da força de preensão dos membros e da actividade motora (incluindo informação pormenorizada sobre dispositivos automáticos de detecção de actividade); e de outros procedimentos efectuados;

— informação pormenorizada sobre os exames oftalmológicos e, caso seja adequado, análises clínicas (hemograma e química clínica) com valores relevantes de linha de base;

— informação pormenorizada sobre os procedimentos neurocomportamentais, neuropatológicos, neuroquímicos e electrofisiológicos específicos.

Resultados:

— peso corporal/alterações do peso corporal, incluindo o peso corporal na altura da morte;

— consumo de alimento e consumo de água, sempre que necessário;

— dados sobre a resposta à toxicidade para cada sexo e nível de dosagem, incluindo sintomas de toxicidade ou mortalidade;

— natureza, gravidade e duração (momento do aparecimento e desenvolvimento subsequente) dos efeitos detectados em observações clínicas aprofundadas (reversíveis ou não);

— descrição pormenorizada de todos os resultados dos ensaios funcionais;

— resultados da autópsia;

— descrição pormenorizada de todos os dados neurocomportamentais, neuropatológicos e neuroquímicos ou electrofisiológicos, caso estejam disponíveis;

— dados de absorção e metabolismo, caso estejam disponíveis;

— tratamento estatístico dos resultados, se apropriado.

Análise dos resultados:

— informação sobre a resposta à dosagem;

— relação entre quaisquer outros efeitos tóxicos de modo a tirar conclusões sobre o potencial neurotóxico da substância química de ensaio;

— nível sem efeito adverso observável.

Conclusões:

— aconselha-se a inclusão de uma declaração específica sobre a neurotoxicidade global da substância química de ensaio.

4. REFERÊNCIAS

(1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris (em preparação).

(2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (em Teratology).

(3) World Health Organisation (WHO) (1986) Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

(4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H., (1980) Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

(5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B., (1980) Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, p. 999--1003.

(6) Gad, S.C., (1982) A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, p. 691-704.

(7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M., (1991) Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, p. 267-283.

(8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T., (1979) A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, p. 233-236.

(9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C., (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, p. 599-609.

(10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds., (1992) Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

(11) Chang, L.W., ed., (1995) Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

(12) Broxup, B., (1991) Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, p. 689-695.

(13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C., (1992) Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, p. 343-352.

(14) O'Callaghan, J.P., (1988) Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, p. 445-452.

(15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B., (1988) Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, p. 368-378.

(16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G., (1982) Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, p. 299-335.

(17) Johnson, B.L., (1980) Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, p. 726-742.

(18) Bancroft, J.D. and Steven A., (1990) Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Tabela 1

Número mínimo de animais necessários, em cada grupo, para se realizar o ensaio de neurotoxicidade de forma independente ou em conjunto com outros estudos

	MODO DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO DE TOXICIDADE			
	Estudo independente	Em combinação com o estudo de 28 dias	Em combinação com o estudo de 90 dias	Em combinação com o estudo de toxicidade crónica
Número total de animais por grupo	10 machos e 10 fêmeas	10 machos e 10 fêmeas	15 machos e 15 fêmeas	25 machos e 25 fêmeas
Número de animais escolhidos para ensaios funcionais, incluindo observações clínicas pormenorizadas	10 machos e 10 fêmeas	10 machos e 10 fêmeas	10 machos e 10 fêmeas	10 machos e 10 fêmeas
Número de animais escolhidos para perfusão *in situ* e neuro-histopatologia	5 machos e 5 fêmeas	5 machos e 5 fêmeas	5 machos e 5 fêmeas	5 machos e 5 fêmeas
Número de animais escolhidos para observações de toxicidade crónica, subcrónica ou relativa à dose, análises clínicas (hemograma, química clínica), histopatologia, etc., tal como descrito nas respectivas *Orientações*		5 machos e 5 fêmeas	10 machos † e 10 fêmeas †	20 machos † e 20 fêmeas †
Observações complementares, se apropriado	5 machos e 5 fêmeas			

† Inclui cinco animais escolhidos para ensaios funcionais e observações clínicas pormenorizadas como parte integrante do estudo de neurotoxicidade.

▼B

Tabela 2

Frequência das observações clínicas e dos ensaios funcionais

Tipo de observações		Duração do estudo			
		Aguda	28 dias	90 dias	Crónica
Em todos os animais	Estado geral de saúde	diária	diária	diária	diária
	Mortalidade/ /morbilidade	duas vezes ao dia	duas vezes ao dia	duas vezes ao dia	duas vezes ao dia
Nos animais escolhidos para as observações funcionais	Observações clínicas pormenorizadas	— antes do início do estudo — após 8 horas da administração da dose, no momento em que se espera uma resposta máxima — nos dias 7 e 14 após a administração da dose	— antes do início do estudo — uma vez por semana, daí em diante	— antes do início do estudo — uma vez, durante a primeira ou segunda semana, após o início do ensaio — uma vez por mês, daí em diante	— antes do início do estudo — uma vez decorrido um mês após o início do ensaio — de três em três meses, daí em diante
	Ensaios funcionais	— antes do início do estudo — após 8 horas da administração da dose, no momento em que se espera uma resposta máxima — nos dias 7 e 14 após a administração da dose	— antes do início do estudo — durante a quarta semana de tratamento e tão próximo quanto possível do final do período de ensaio	— antes do início do estudo — uma vez, durante a primeira ou segunda semana, após o início do ensaio — uma vez por mês, daí em diante	— antes do início do estudo — uma vez decorrido um mês após o início do ensaio — de três em três meses, daí em diante

▼B

B.44. ABSORÇÃO CUTÂNEA: MÉTODO *IN VIVO*

1. MÉTODO

O presente método de ensaio é equivalente ao método OECD TG 427 (2004).

1.1. INTRODUÇÃO

Embora a exposição a numerosas substâncias químicas envolva sobretudo a pele, na maior parte dos estudos toxicológicos em animais de laboratório é utilizada a via de administração oral. O estudo de absorção percutânea *in vivo* a que se refere o presente método constitui o elo necessário para a extrapolação dos resultados de estudos orais para a avaliação da inocuidade em caso de exposição cutânea.

Para atingir a corrente sanguínea, uma substância tem que atravessar numerosas camadas celulares da pele. A camada limitante da velocidade de penetração é o estrato córneo, constituído por células mortas. A permeabilidade da pele depende da lipofilia da substância química e da espessura da camada externa da epiderme, e ainda de outros factores, como o peso molecular e a concentração da substância. A pele dos ratos e dos coelhos é, em geral, mais permeável do que a do homem, ao passo que a permeabilidade da pele das cobaias e dos macacos se assemelha mais à da pele humana.

Os métodos de medição da absorção percutânea podem ser divididos em duas categorias: *in vivo* e *in vitro*. O método *in vivo* permite obter informações fiáveis sobre a absorção cutânea em várias espécies de laboratório. Mais recentemente foram desenvolvidos métodos *in vitro* baseados no transporte através de pele total ou de pele de clivagem, humana ou de animais, para um reservatório de fluido. O método *in vitro* encontra-se descrito num método de ensaio distinto (1). Na escolha do método mais apropriado para determinada situação recomenda-se a consulta do documento de orientação da OCDE para a realização de ensaios de absorção cutânea (2), no qual é tratada em mais pormenor a utilidade dos métodos *in vivo* e *in vitro*.

O método *in vivo* aqui descrito permite determinar a penetração da substância ensaiada no compartimento sistémico através da pele. A técnica tem sido amplamente utilizada desde há muitos anos (3) (4) (5) (6) (7). Embora os estudos de absorção percutânea *in vitro* sejam muitas vezes adequados, pode haver situações em que só um estudo *in vivo* permitirá obter os dados necessários.

As vantagens do método *in vivo* são a utilização de um sistema fisiológica e metabolicamente intacto, o uso da mesma espécie em muitos estudos de toxicidade e a possibilidade de adaptação para utilização com outras espécies. As desvantagens são a utilização de animais vivos, a necessidade de marcadores radioactivos para facilitar a obtenção de resultados fiáveis, a dificuldade de determinação da fase inicial da absorção e as diferenças de permeabilidade cutânea entre a espécie mais utilizada (rato) e o homem. A pele dos animais é normalmente mais permeável, o que pode levar a sobrestimar a absorção percutânea no homem (6) (8) (9). As substâncias cáusticas ou corrosivas não devem ser ensaiadas em animais vivos.

▼B

1.2. DEFINIÇÕES

Dose não absorvida: a que é removida da superfície cutânea após a exposição, por lavagem, ou que esteja eventualmente presente na cobertura não oclusiva, incluindo a que eventualmente se demonstre ter-se volatilizado da pele durante a exposição.

Dose absorvida (*in vivo*): inclui a que está presente na urina, nos resíduos de lavagem das gaiolas, nas fezes, no ar expirado (se tiver sido determinada), no sangue, nos tecidos (caso se proceda à sua colheita) e no resto da carcaça, uma vez retirada a pele do local de aplicação.

Dose absorvível: a que permanece na pele, ou à superfície desta, após a lavagem.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância a ensaiar, de preferência marcada com um radioisótopo, é aplicada na pele tosquiada em dose(s) adequada(s) na forma de uma preparação representativa, tal como é normalmente utilizada. A preparação ensaiada é deixada em contacto com a pele durante um período determinado, coberta de forma adequada (não oclusiva, semioclusiva ou oclusiva) para evitar que seja ingerida. Terminado o tempo de exposição, a pele é descoberta e limpa com um agente de limpeza adequado, conservando-se para análise a cobertura e os materiais utilizados na limpeza e tornando a aplicar-se uma cobertura limpa. Antes, durante e após o período de exposição, os animais são alojados em gaiolas de metabolismo individuais, devendo as excreções e o ar expirado durante esse período ser recolhidos para análise. A recolha do ar expirado pode ser omitida se os dados existentes permitirem concluir que a formação de metabolito radioactivo volátil é reduzida ou nula. Em cada estudo, vários grupos de animais serão normalmente expostos à preparação ensaiada. Um dos grupos será sacrificado no final do período de exposição. Os restantes grupos serão sacrificados posteriormente, a intervalos predeterminados (2). No final do período de amostragem, os animais restantes são sacrificados, procedendo-se à colheita de sangue e remoção do local de aplicação, para análise, e à pesquisa de material não excretado na carcaça. Após análise das amostras por meios adequados é feita a estimativa do grau de absorção cutânea (6) (8) (9).

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.4.1. **Escolha da espécie animal**

O rato é a espécie mais utilizada, mas podem igualmente usar-se estirpes glabras e espécies com taxas de absorção cutânea mais semelhantes às do homem (3) (6) (7) (8) (9). Devem utilizar-se adultos saudáveis, todos do mesmo sexo (por defeito, machos), das estirpes correntemente utilizadas em laboratório. No início do estudo, a variação no peso dos animais não deve exceder ± 20 % do peso médio. Podem utilizar-se, por exemplo, ratos machos de 200 g a 250 g, sobretudo aqueles cujo peso se situe na metade superior deste intervalo.

▼B

1.4.2. **Número e sexo dos animais**

Deve utilizar-se um grupo de pelo menos quatro animais, todos do mesmo sexo, por cada preparação ensaiada e por cada um dos pontos terminais previstos. Cada grupo de animais será sacrificado após um intervalo diferente, por exemplo, no termo do período de exposição (geralmente, 6 ou 24 horas) e de subsequentes períodos equivalentes (48 e 72 horas, por exemplo). Caso existam dados comprovativos de diferenças substanciais entre machos e fêmeas, no que diz respeito à toxicidade cutânea, deve escolher-se o sexo mais sensível. Caso não existam tais dados, pode ser utilizado qualquer um dos sexos.

1.4.3. **Condições de alojamento e alimentação**

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser de 22 °C (± 3 °C). A humidade relativa deverá ser de 50 %-60 %, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30 % e um máximo que, preferivelmente, não deverá exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A alimentação, que deve ser fornecida sem restrições, pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber. Durante o estudo e, de preferência, também durante a aclimatação, os animais serão alojados em gaiolas de metabolismo individuais. Uma vez que o derrame de alimentos e água pode comprometer os resultados do estudo, é conveniente reduzir ao mínimo a probabilidade da sua ocorrência.

1.4.4. **Preparação dos animais**

Os animais são marcados de forma a poderem ser identificados individualmente e mantidos nas gaiolas pelo menos nos cinco dias anteriores ao início do estudo, para se aclimatarem às condições do laboratório.

Após o período de aclimatação, e cerca de 24 horas antes da administração, os animais serão tosquiados na região dos ombros e do dorso. Uma vez que as propriedades de permeação da pele lesada e da pele intacta são diferentes, deve tomar-se cuidado para não lesar a pele. Após a tosquia, e cerca de 24 horas antes de aplicar a substância a ensaiar (ver ponto 1.4.7), a superfície da pele deve ser limpa com acetona, para retirar o sebo. Não é aconselhável lavar novamente com água e sabão, já que quaisquer resíduos de sabão poderão favorecer a absorção da substância ensaiada. A área deve ser suficiente para permitir uma estimativa fiável da quantidade de substância ensaiada que é absorvida por cm^2 de pele — de preferência, 10 cm^2, pelo menos, o que é praticável em ratos com peso vivo entre 200 e 250 g. Após a preparação, os animais voltam a ser colocados nas gaiolas de metabolismo.

1.4.5. **Substância a ensaiar**

A substância a ensaiar é a entidade de que se pretendem estudar as propriedades de penetração. De preferência, a substância a ensaiar deve ser marcada com um radioisótopo.

1.4.6. **Preparação a ensaiar**

A preparação com a substância a ensaiar (por exemplo, material puro, diluído ou formulado contendo a substância a ensaiar e que se aplica na pele) deve ser aquela a que poderão estar expostos o homem ou outras espécies potencialmente visadas, ou um substituinte realista da mesma. Qualquer mudança em relação à preparação tal como é utilizada deve ser justificada. Se for necessário, a substância a ensaiar pode ser dissolvida ou suspensa num excipiente apropriado. As características de absorção dos excipientes — excepto a água — e a sua eventual interacção com a substância ensaiada devem ser conhecidos.

▼B

1.4.7. **Aplicação na pele**

Definir na superfície da pele um local de aplicação com uma área determinada. Aplicar em seguida nesse local, uniformemente, uma quantidade conhecida da preparação a ensaiar. Normalmente, a quantidade aplicada deve simular a exposição humana potencial, geralmente 1-5 mg/cm^2 para os sólidos e 10 $\mu l/cm^2$ para os líquidos. A utilização de outras quantidades deve ser justificada com base nas condições de utilização previstas, nos objectivos do estudo ou nas características físicas da preparação a ensaiar. Após a aplicação, o sítio tratado deve ser protegido, de forma a impedir que o animal se limpe. A figura 1 mostra um exemplo de dispositivo típico. O local de aplicação é normalmente protegido por uma cobertura não oclusiva (gaze de nylon permeável, por exemplo). Contudo, para aplicações infinitas, a cobertura do local de aplicação deve ser oclusiva. Em caso de ensaio de substâncias semivoláteis é necessário, se a evaporação provocar uma diminuição inaceitável da taxa de recuperação da substância ensaiada (ver também o primeiro parágrafo do ponto 1.4.10), captar a substância evaporada num filtro de carvão que cubra o dispositivo de aplicação (ver figura 1). É importante que o dispositivo não danifique a pele, nem absorva a preparação ensaiada ou reaja com ela. Os animais são depois novamente colocados nas gaiolas de metabolismo individuais, para recolha das excreções.

1.4.8. **Duração da exposição e da amostragem**

A duração da exposição é o tempo que decorre entre a aplicação e a remoção da preparação ensaiada por lavagem da pele. O período de exposição utilizado (geralmente, 6 ou 24 horas) deve ser adequado à duração provável da exposição humana. Terminado o período de exposição, os animais são mantidos nas gaiolas de metabolismo até ao termo previsto do ensaio. Os animais devem ser observados regularmente durante toda a duração do estudo, para detecção de sinais de toxicidade ou de reacções anormais. No final do período de exposição, a pele tratada deve ser observada para detecção de sinais visíveis de irritação.

As gaiolas de metabolismo devem permitir a recolha individual da urina e das fezes durante todo o estudo. É também conveniente que possibilitem a recolha do dióxido de carbono e compostos voláteis marcados com ^{14}C, que devem ser analisados caso sejam produzidos em quantidade (> 5 %). A urina, as fezes e os fluidos captados (dióxido de carbono e compostos de carbono voláteis marcados com ^{14}C, por exemplo) devem ser recolhidos individualmente em cada grupo, aquando de cada amostragem. Se os dados existentes permitirem concluir que a formação de metabolito radioactivo é reduzida ou nula podem ser utilizadas gaiolas abertas.

As excreções são recolhidas durante o período de exposição, até 24 horas após o contacto inicial com a pele e, em seguida, diariamente até ao final da experiência. Embora três intervalos de recolha de excreções sejam normalmente suficientes, pode ser conveniente dispor de pontos experimentais mais adequados, ou mais numerosos, atendendo à finalidade a que se destina a preparação ensaiada ou aos dados cinéticos existentes.

No final do período de exposição, o dispositivo de protecção de cada animal é retirado e conservado separadamente, para análise. Em todos os animais, a pele tratada deve ser lavada pelo menos três vezes com um agente de limpeza, utilizando zaragatoas apropriadas. Deve ter-se cuidado para evitar contaminar outras partes do corpo. O agente de limpeza deve ser representativo das práticas usuais de higiene — uma solução aquosa de sabão, por exemplo. Por fim, a pele deve ser enxugada. Todas as zaragatoas e resíduos da lavagem devem ser conservados para análise. Nos animais dos grupos correspondentes aos pontos experimentais mais tardios, o sítio tratado deve, antes do regresso às gaiolas individuais, tornar a ser protegido com uma cobertura limpa.

▼B

1.4.9. **Procedimentos finais**

Em cada grupo, os animais devem ser sacrificados no momento previsto, procedendo-se à colheita de sangue para análise. A cobertura de protecção deve ser retirada para análise. A pele do local de aplicação, bem como uma área semelhante de pele tosquiada não tratada, devem ser removidas de cada animal para serem analisadas separadamente. A pele do local de aplicação pode ser clivada, para separar o estrato córneo da epiderme subjacente, a fim de se obterem mais informações sobre a distribuição da substância em estudo. A determinação da evolução desta distribuição ao longo do tempo, após o período de exposição, deveria dar alguma indicação quanto ao destino da substância química em estudo eventualmente presente no estrato córneo. Para facilitar a clivagem da pele (após a lavagem final da pele e o sacrifício do animal), a cobertura de protecção é removida. A pele do local de aplicação, incluindo a coroa circular circundante, é excisada do rato e fixada com alfinetes numa placa. Aplicar uma fita adesiva sobre a pele, pressionando suavemente, e retirar a fita adesiva, que trará consigo parte do estrato córneo. Repetir o processo com novas fitas adesivas até ao momento em que, uma vez removido inteiramente o estrato córneo, a fita deixa de aderir à pele. Todas as fitas adesivas utilizadas para cada animal podem ser depositadas no mesmo recipiente, adicionando-se-lhes em seguida um digestor de tecidos para solubilização do estrato córneo. Os tecidos-alvo potenciais podem ser removidos para medições separadas, antes da análise do resto da carcaça para determinação da dose absorvida na carcaça. As carcaças dos animais devem ser conservadas individualmente para análise. A análise do teor total será, normalmente, suficiente. Os órgãos-alvo podem ser retirados para serem analisados individualmente (se outros estudos assim o indicarem). A urina presente na bexiga aquando do sacrifício programado deve ser adicionada à urina recolhida anteriormente. Após a recolha das excreções presentes nas gaiolas de metabolismo no momento do sacrifício programado, as gaiolas e os sistemas de captação devem ser lavados com um solvente adequado. O restante equipamento potencialmente contaminado deve também ser analisado.

1.4.10. **Análise**

Em todos os estudos, deve obter-se uma taxa de recuperação adequada (a média a obter será de 100 ± 10 % da radioactividade). Taxas de recuperação fora desse intervalo devem ser justificadas. A quantidade da dose administrada presente em cada amostra deve ser determinada por processos devidamente validados.

A análise estatística deve incluir a determinação da variância para as repetições de cada aplicação.

2. **DADOS**

Em relação a cada animal, e em cada amostragem para pesquisa da substância ensaiada ou dos seus metabolitos, devem ser feitas as seguintes determinações (além de serem apresentados individualmente, os dados devem também ser agrupados por tempos de amostragem e apresentados sob forma de médias):

— quantidade associada aos dispositivos de protecção,

— quantidade que pode ser retirada da pele,

— quantidade presente na pele que não pode ser removida por lavagem,

▼B

— quantidade presente no sangue colhido,

— quantidade presente nas excreções e no ar expirado (se for caso disso),

— quantidade restante na carcaça e em órgãos eventualmente retirados para serem analisados separadamente.

Com base na quantidade de substância ensaiada e/ou dos seus metabolitos nas excreções, no ar expirado, no sangue e na carcaça poder-se-á determinar a quantidade total absorvida em cada um dos pontos experimentais. Pode também ser calculada a quantidade de substância ensaiada que foi absorvida por cm^2 de pele exposta, ao longo do período de exposição.

3. RELATÓRIOS

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir os requisitos especificados no protocolo, nomeadamente a justificação da escolha do sistema experimental utilizado, devendo conter os seguintes elementos:

Substância ensaiada:

— dados relativos à identificação [número CAS, se existir; proveniência; pureza (pureza radioquímica); impurezas conhecidas; número do lote; etc.],

— natureza física, propriedades físico-químicas (por exemplo, pH, volatilidade, solubilidade, estabilidade, peso molecular e log P_{oa}).

Preparação ensaiada:

— formulação e justificação da utilização,

— informações sobre a preparação ensaiada, quantidade aplicada, concentração atingida, excipiente, estabilidade e homogeneidade.

Animais experimentais:

— espécie/estirpe usada;

— número, idade e sexo dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.,

— peso de cada animal no início do ensaio.

Condições experimentais:

— informações relativas à administração da preparação ensaiada (local de aplicação, métodos de determinação, oclusão ou não, volume, extracção, detecção),

— informações sobre a qualidade dos alimentos e da água.

Resultados:

— quaisquer sinais de toxicidade,

— quadro dos valores de absorção (expressos em taxa, quantidade ou percentagem),

▼B

— taxas de recuperação globais do ensaio,

— interpretação dos resultados, comparação com dados eventualmente existentes sobre a absorção percutânea do composto ensaiado.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Método de ensaio B.45. Absorção cutânea: método *in vitro*.

(2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

(3) ECETOC, (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No 20.

(4) Zendzian, R.P., (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol*. 8(5), p. 829-835.

(5) Kemppainen, B.W., Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

(6) EPA, (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

(7) EPA, (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

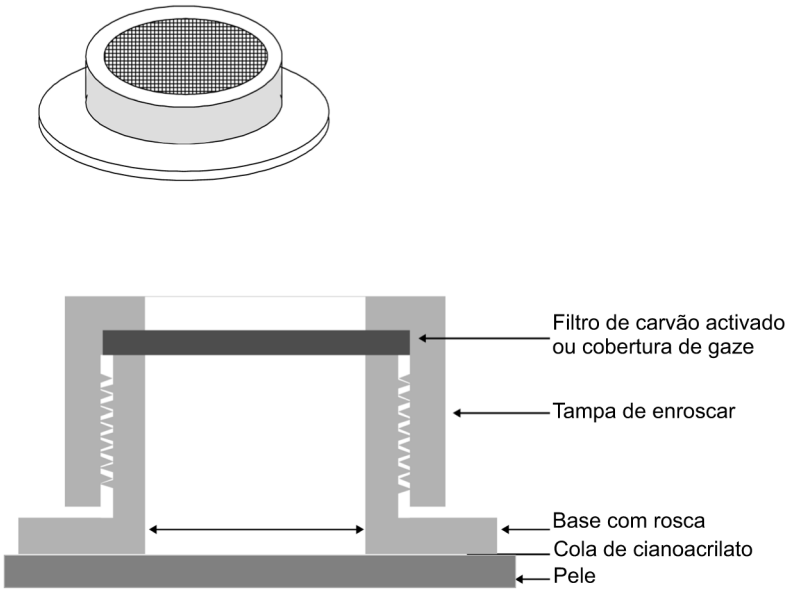
(8) Bronaugh, R.L., Wester, R.C., Bucks, D., Maibach H.I. and Sarason, R., (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic*. 28, p. 369-373.

(9) Feldman, R.J. and Maibach, H.I., (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol*. 54, p. 399-404.

▼B

Figura 1

Exemplo de esquema de dispositivo tipicamente utilizado para definir e proteger o local de aplicação cutânea nos estudos de absorção percutânea *in vivo*



▼B

B.45. ABSORÇÃO CUTÂNEA: MÉTODO *IN VITRO*

1. MÉTODO

O presente método de ensaio é equivalente ao método OECD TG 428 (2004).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método foi concebido para a obtenção de informações sobre a absorção de uma substância a ensaiar quando aplicada em pele excisada; pode ser combinado com o «Método de absorção cutânea: método *in vivo*» (1) ou utilizado separadamente. No delineamento de estudos baseados no presente método, recomenda-se a consulta do documento de orientação da OCDE para a realização de ensaios de absorção cutânea (2). O referido documento de orientação foi elaborado no intuito de facilitar a escolha de processos *in vitro* adequados para utilização em circunstâncias específicas, de forma a garantir a fiabilidade dos resultados obtidos pelo presente método.

Os métodos de medição da absorção cutânea e da transferência através da pele podem dividir-se em duas categorias: *in vivo* e *in vitro*. Os métodos de absorção cutânea *in vivo* estão já consagrados, permitindo obter dados farmacocinéticos em diversas espécies animais. Num método de ensaio distinto (1) é feita a descrição de um método *in vivo*. Os métodos *in vitro* são também utilizados há muitos anos para medir a absorção cutânea. Embora não tenham sido efectuados estudos de validação formal dos métodos *in vitro* abrangidos pelo presente método de ensaio, os peritos da OCDE acordaram em 1999 em que os dados avaliados existentes eram suficientes para apoiar o método *in vitro* (3). No documento de orientação (2) são fornecidos elementos comprovativos adicionais, incluindo diversas comparações directas de métodos *in vitro* e *in vivo*. O assunto foi também tratado em diversas monografias, que contêm informações básicas pormenorizadas sobre o uso de um método *in vitro* (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Os métodos *in vitro* medem a difusão de substâncias químicas para a pele e, através desta, para um reservatório de fluido, podendo ser utilizada pele não viável, apenas para medir a difusão, ou pele fresca, metabolicamente activa, para medir simultaneamente a difusão e o metabolismo cutâneo. Estes métodos revelaram-se muito úteis na triagem de diferentes formulações quanto à sua utilidade na transferência de substâncias químicas para a pele e através dela, podendo também constituir modelos úteis na avaliação da absorção percutânea no homem.

O método *in vitro* pode não ser aplicável em todas as situações e a todos os tipos de substâncias químicas. Por vezes pode utilizar-se o método de ensaio *in vitro* para uma avaliação qualitativa inicial da penetração cutânea. Em certos casos, poderá ser necessário completar esta avaliação com dados *in vivo*. Para mais pormenores sobre as situações em que a utilização do método *in vitro* poderá ser adequada, consultar o documento de orientação (2). A referência (3) contém informações pormenorizadas adicionais de apoio à decisão.

No presente método são apresentados os princípios gerais em que assenta a medição da absorção cutânea e subsequente transferência através da pele de uma substância a ensaiar, utilizando pele excisada. Pode ser utilizada pele de muitas espécies de mamíferos, incluindo o homem. As propriedades de permeabilidade da pele mantêm-se após a excisão, porque o principal obstáculo à difusão é o estrato córneo não viável, não tendo sido detectado o transporte percutâneo activo de substâncias químicas. Apesar de ter sido demonstrado que a pele é capaz de metabolizar algumas substâncias durante a absorção percutânea (6), trata-se de um processo que não é limitante em termos de dose efectivamente absorvida, embora possa afectar a natureza das substâncias introduzidas na corrente sanguínea.

▼B

1.2. DEFINIÇÕES

Dose não absorvida: a que é removida da superfície cutânea após a exposição, por lavagem, ou que esteja eventualmente presente na cobertura não oclusiva, incluindo a que eventualmente se demonstre ter-se volatilizado da pele durante a exposição.

Dose absorvida (*in vitro*): massa de substância a ensaiar que atinge o fluido receptor ou a circulação sistémica num período especificado.

Dose absorvível (*in vitro*): a que permanece na pele, ou à superfície desta, após a lavagem.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância a ensaiar, que pode ser marcada com um radioisótopo, é aplicada na superfície de uma amostra de pele que separa as duas câmaras de uma célula de difusão. A substância química permanece sobre a pele por um período e em condições especificados, antes de ser retirada por um processo de limpeza adequado. A intervalos determinados ao longo da experiência colhem-se amostras do fluido receptor, que são depois analisadas para detecção da substância a ensaiar e/ou dos seus metabolitos.

Caso se utilizem sistemas metabolicamente activos, os metabolitos da substância a ensaiar podem ser analisados por métodos adequados. No final da experiência quantifica-se, se for caso disso, a distribuição da substância a ensaiar e dos seus metabolitos.

Utilizando condições adequadas, descritas no presente método e no documento de orientação (2), a absorção durante determinado período da substância ensaiada é medida por análise do fluido receptor e da pele tratada. A substância ensaiada que permanece na pele deve ser considerada como absorvida, excepto se for possível demonstrar que a absorção pode ser determinada com base apenas nos valores relativos ao fluido receptor. A análise dos outros elementos (material removido da pele por lavagem, ou que permanece nas camadas da pele) permite uma avaliação complementar dos resultados, nomeadamente por determinação da distribuição total da substância ensaiada e da taxa de recuperação.

Os resultados obtidos com substâncias de referência pertinentes devem encontrar-se disponíveis e estar em conformidade com a bibliografia relativa ao método utilizado, a fim de demonstrar a eficiência e fiabilidade do sistema de ensaio no laboratório executante. Para o preenchimento desta condição pode ser efectuado concomitantemente o ensaio de uma substância de referência adequada (de preferência, com uma lipofilia próxima da da substância em ensaio) e da substância a ensaiar, ou ser fornecidos dados anteriores adequados para várias substâncias de referência de lipofilias diferentes (por exemplo, cafeína, ácido benzóico e testosterona).

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Célula de difusão**

Uma célula de difusão é constituída por uma câmara dadora e uma câmara receptora, estando a pele colocada entre as duas câmaras (na figura 1 apresenta-se um exemplo de esquema típico deste dispositivo). A célula deve garantir uma boa vedação em torno da pele e permitir uma amostragem fácil e uma mistura eficaz da solução receptora em contacto com a face interna da pele, e um bom controlo da temperatura da célula e do seu conteúdo. Podem ser utilizadas células de difusão estáticas ou de fluxo. Normalmente, o compartimento dador é deixado descoberto durante a exposição a uma dose finita da preparação a ensaiar. Contudo, para aplicações infinitas e em certos casos de aplicações finitas, as câmaras dadoras podem ser fechadas.

▼B

1.4.2. **Fluido receptor**

É preferível a utilização de um fluido receptor fisiologicamente compatível, embora possam também utilizar-se outros, desde que a sua utilização seja fundamentada. Deve ser dada a composição exacta do fluido receptor. Deve ser demonstrada a solubilidade adequada da substância a ensaiar no fluido receptor, de forma a que este não constitua um obstáculo à absorção. Além disso, o fluido receptor não deve afectar a integridade da preparação de pele. Num sistema de fluxo, o débito não deve dificultar a difusão da substância a ensaiar no fluido receptor. Num sistema de célula estática, o fluido deve ser agitado continuamente, devendo colher-se amostras a intervalos regulares. Caso esteja a ser estudado o metabolismo, o fluido receptor deve permitir manter a viabilidade da pele durante toda a experiência.

1.4.3. **Preparações de pele**

Pode ser utilizada pele de origem humana ou animal. Reconhece-se que a utilização de pele humana está sujeita a considerações e condições éticas nacionais e internacionais. Embora seja preferível pele viável, pode ser também utilizada pele não viável, desde que a sua integridade possa ser demonstrada. Podem utilizar-se membranas epidérmicas (separadas por métodos enzimáticos, térmicos ou químicos) ou pele de clivagem (geralmente com 200-400 μm de espessura) preparada com um dermátomo. Pode ser utilizada pele total, mas deve evitar-se uma espessura excessiva (superior a cerca de 1 mm), excepto quando seja especificamente exigida para a determinação da substância a ensaiar nas camadas da pele. A escolha da espécie, do local anatómico e da técnica de preparação deve ser justificada. Exigem-se dados aceitáveis de um mínimo de quatro repetições por preparação ensaiada.

1.4.4. **Integridade da preparação de pele**

É essencial que a pele seja convenientemente preparada. Um manuseio incorrecto pode danificar o estrato córneo, sendo necessário, por conseguinte, verificar a integridade da pele depois de preparada. Caso esteja em estudo o metabolismo cutâneo, a pele recém-excisada deve ser utilizada o mais depressa possível, em condições que permitam comprovadamente manter a actividade metabólica. A título de orientação, a pele recém-excisada deve em geral ser utilizada no prazo de 24 horas, embora o período de armazenagem aceitável varie em função do sistema enzimático que intervém na metabolização e das temperaturas de armazenagem (13). Caso as preparações de pele tenham estado armazenadas antes de serem utilizadas, deverão apresentar-se provas de que a função de barreira se mantém.

1.4.5. **Substância a ensaiar**

A substância a ensaiar é a entidade de que se pretendem estudar as propriedades de penetração. De preferência, a substância a ensaiar deve ser marcada com um radioisótopo.

1.4.6. **Preparação a ensaiar**

A preparação com a substância a ensaiar (por exemplo, material puro, diluído ou formulado contendo a substância a ensaiar e que se aplica na pele) deve ser aquela a que poderão estar expostos o homem ou outras espécies potencialmente visadas, ou um substituinte realista da mesma. Qualquer mudança relativamente à preparação tal como é utilizada deve ser justificada.

▼B

1.4.7. **Concentrações e formulações das substâncias a ensaiar**

Utilizam-se normalmente várias concentrações da substância a ensaiar, de forma a cobrir os valores mais elevados de exposição humana potencial. Da mesma maneira, deve ser considerado o ensaio de várias formulações típicas.

1.4.8. **Aplicação na pele**

Em condições normais, o homem é exposto a doses finitas de substâncias químicas. Deve utilizar-se, por conseguinte, uma aplicação que simule as condições de exposição do homem, ou seja, normalmente, de 1-5 mg/cm^2 de pele para os sólidos e de até 10 $\mu l/cm^2$ para os líquidos. A quantidade deve ser justificada com base nas condições de utilização previstas, nos objectivos do estudo ou nas características da preparação a ensaiar. Por exemplo, com a aplicação de grandes volumes por unidade de superfície as aplicações à superfície da pele podem ser infinitas.

1.4.9. **Temperatura**

A temperatura afecta a difusão passiva das substâncias químicas — e também, por conseguinte, a sua absorção pela pele. A câmara de difusão e a pele devem ser mantidas a temperatura constante, próxima da temperatura normal da pele, de 32 +/-1ºC. A temperatura do banho-maria ou da manta de aquecimento que é necessária para manter o fluido receptor e a pele à temperatura fisiológica dependerá da concepção da célula. A humidade deve, de preferência, ser mantida entre 30 % e 70 %.

1.4.10. **Duração da exposição e da amostragem**

A exposição da pele à preparação a ensaiar pode manter-se durante todo o ensaio ou limitar-se a períodos mais curtos (para simular um tipo específico de exposição do homem). A lavagem da pele para remover o excesso de preparação a ensaiar deve ser feita com um agente de limpeza adequado, recolhendo-se o líquido de lavagem para análise. A forma de retirar a preparação a ensaiar dependerá das condições de utilização previstas, e deve ser justificada. O período de amostragem exigido é normalmente de 24 h, período que permite caracterizar convenientemente o perfil de absorção. Uma vez que a integridade da pele pode começar a deteriorar-se uma vez excedidas 24 horas, a colheita de amostras não deve normalmente prolongar-se para além deste prazo. Para substâncias de rápida penetração cutânea, esse período pode não ser necessário, mas para substâncias de penetração lenta podem ser necessários períodos mais longos. A frequência de amostragem do fluido receptor deve permitir a representação gráfica do perfil de absorção da substância a ensaiar.

1.4.11. **Procedimentos finais**

Todos os componentes do sistema de ensaio devem ser analisados, devendo determinar-se a taxa de recuperação. Os componentes incluem a câmara dadora, o líquido de lavagem superficial da pele, a preparação de pele, o fluido receptor e a respectiva câmara. Nalguns casos, a pele pode ser fraccionada em pele com a superfície exposta e pele sob a flange da célula, e em estrato córneo, epiderme e derme, analisando-se cada fracção separadamente.

1.4.12. **Análise**

Em todos os estudos, deve obter-se uma taxa de recuperação adequada (a média a obter será de 100 +/- 10 % da radioactividade, devendo os eventuais desvios ser justificados). A quantidade de substância a ensaiar presente no fluido receptor, na preparação de pele, no líquido de lavagem superficial da pele e no líquido de lavagem do aparelho deve ser determinada por método adequado.

▼B

2. **RESULTADOS**

Deve apresentar-se a análise do fluido receptor, a distribuição da substância química ensaiada no sistema de ensaio e a evolução da absorção ao longo do tempo. Caso sejam utilizadas condições de exposição a uma dose finita, deve ser calculada a quantidade removida da pele por lavagem, a quantidade associada à pele (e às suas diferentes camadas, caso sejam analisadas) e a quantidade presente no fluido receptor (taxa, e quantidade ou percentagem da dose aplicada). A absorção cutânea pode por vezes ser expressa utilizando apenas os dados do fluido receptor. Contudo, caso a substância ensaiada permaneça na pele no final do ensaio, pode ser necessário incluí-la na quantidade total absorvida [ver ponto 66 da referência (3)]. Quando se utilizem condições de exposição a uma dose infinita os dados podem permitir o cálculo de uma constante de permeabilidade (Kp). Nestas últimas condições, a percentagem absorvida é irrelevante.

3. **RELATÓRIOS**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir os requisitos especificados no protocolo, nomeadamente a justificação da escolha do sistema de ensaio utilizado, devendo conter os seguintes elementos:

Substância a ensaiar:

— natureza física, propriedades físico-químicas (pelo menos, peso molecular e log P_{oa}), pureza (pureza radioquímica),

— dados relativos à identificação (por exemplo, número do lote),

— solubilidade no fluido receptor.

Preparação a ensaiar:

— formulação e justificação da utilização,

— homogeneidade.

Condições do ensaio:

— origem e local de proveniência da pele, método de preparação, condições de armazenagem antes da utilização, eventuais pré-tratamentos (limpeza, tratamentos antibióticos, etc.), medições da integridade da pele, estado metabólico, justificação da utilização,

— concepção da célula, composição do fluido receptor, débito do fluido receptor ou intervalos e processos de amostragem,

— informações pormenorizadas quanto à aplicação da preparação a ensaiar e à quantificação da dose aplicada,

— duração da exposição,

— informações sobre a remoção da preparação a ensaiar da pele, por exemplo, por lavagem,

— informações sobre a análise da pele e as técnicas de clivagem eventualmente utilizadas na demonstração da distribuição cutânea,

▼B

— processos de lavagem da célula e do equipamento,

— métodos de determinação analítica, técnicas de extracção, limites de detecção e validação do método analítico.

Resultados:

— taxas de recuperação globais do ensaio (Dose aplicada = Líquido de lavagem da pele + Pele + Fluido receptor + Líquido de lavagem da célula),

— quadro das taxas de recuperação em cada compartimento da célula,

— perfil de absorção,

— quadro dos valores de absorção (expressos em taxa, quantidade ou percentagem).

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Método de ensaio B.44. Absorção cutânea: Método *in vivo*.

(2) OECD, (2002) Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

(3) OECD, (2000) Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

(4) Kemppainen B.W. and Reifenrath W.G., (1990) Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

(5) Bronaugh R.L. and Collier, S.W., (1991) Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, p. 237--241.

(6) Bronaugh, R.L. and Maibach H.I., (1991) *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s. CRC Press, Boca Raton.

(7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, (1993) Monograph No 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

(8) Diembeck, W., Beck, H., Benech-Kieffer, F., Courtellemont, P., Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, p. 191-205.

(9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No 65.

(10) Howes, D., Guy, R., Hadgraft, J., Heylings, J.R. et al. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

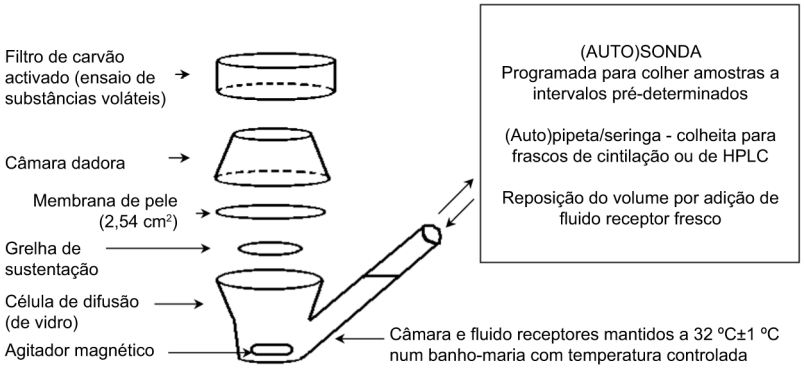
(11) Schaefer, H. and Redelmeier, T.E., (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

(12) Roberts, M.S. and Walters, K.A., (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

(13) Jewell, C., Heylings, J.R., Clowes, H.M. and Williams, F.M. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74, p. 356-365.

Figura 1

Exemplo de esquema típico de uma célula de difusão estática para estudos de absorção percutânea *in vitro*



▼M3

B.46. IRRITAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAIO EM EPIDERME HUMANA RECONSTRUÍDA

INTRODUÇÃO

1. Entende-se por irritação cutânea a produção de danos reversíveis na pele por aplicação de um produto químico em estudo durante, no máximo, quatro horas – definição do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS) e do Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (1) (3). O presente método de ensaio descreve uma técnica *in vitro* que pode ser utilizada para identificar os perigos associados a produtos químicos (substâncias e misturas) irritantes da categoria 2 dos sistemas GHS da ONU e CRE da UE (1) (2) (3). Na UE e noutras zonas geográficas que não adotaram a categoria 3 facultativa do sistema GHS da ONU (irritantes ligeiros), pode também utilizar-se este método para identificar produtos químicos não classificados (rubrica «nenhuma categoria» nos sistemas GHS da ONU e CRE da UE) (1) (3). O presente método pode ser utilizado para determinar o poder de irritação cutânea de produtos químicos e constitui um ensaio independente alternativo a estudos de irritação cutânea *in vivo*, no âmbito de uma estratégia de ensaio sequencial por etapas [(4) e capítulo B.4 deste anexo].

2. A determinação da irritação cutânea tem normalmente utilizado animais de laboratório (*Test Guideline* 404 da OCDE, capítulo B.4 do presente anexo) (4). No contexto da preocupação com o bem-estar animal, o método B.4 foi revisto em 2004 e permite determinar a corrosão/irritação cutânea por aplicação de uma estratégia de ensaio sequencial, por etapas, com base em métodos *in vitro* e *ex vivo* validados, assim se evitando o sofrimento de animais. A OCDE adotou, como *Test Guidelines*, três métodos de ensaio *in vitro* validados, com os números 430, 431 e 435 (5) (6) (7), constituindo dois deles os capítulos B.40 e B.40A do presente anexo. Destinam-se a ser utilizados para a componente «corrosividade» da estratégia de ensaio por etapas do método B.4 ou do *Test Guideline* 404 da OCDE (4).

3. O presente método dá indicações quanto à irritação cutânea no ser humano. Baseia-se em epiderme humana reconstruída, cuja conceção geral (utilização de queratinócitos de epiderme humana não transformados como fonte celular, tecido representativo e citoarquitectura) reproduz com muita fidelidade as propriedades bioquímicas e fisiológicas das camadas superiores da pele humana, isto é, da epiderme. O método inclui ainda uma série de normas de desempenho (apêndice 2) para avaliação de métodos similares ou modificados que utilizam epiderme humana reconstruída, desenvolvidos pela ECVAM da UE (8) de acordo com os princípios do documento de orientação (*Guidance Document*) n.º 34 da OCDE (9).

4. Estão validados três métodos conformes com o presente método de ensaio. Concluíram-se os estudos de pré-validação, otimização e validação de um método *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) baseado num modelo de epiderme humana reconstruída, comercializado com a designação EpiSkin™ (método de referência validado). Dois outros métodos *in vitro*, comercializados com as designações EpiDerm™ SIT (EPI-200) e SkinEthic™ RHE (22), destinados a determinações de irritação cutânea e que utilizam epiderme humana reconstruída, deram resultados similares ao do método de referência validado, por aplicação das normas de desempenho estabelecidas para efeitos de validação (21).

▼M3

5. Antes de se poder utilizar, numa perspetiva normativa, um ensaio *in vitro* proposto, similar ou modificado, baseado em epiderme humana reconstruída, diverso do método de referência validado, do método EpiDerm™ SIT (EPI-200) e do método SkinEthic™ RHE, importa determinar a fiabilidade, a adequação (exatidão) e as limitações do método em causa na utilização proposta, para garantir a similitude com o método de referência validado, em conformidade com as normas de desempenho estabelecidas no presente método (apêndice 2). Recomenda-se a consulta do *Explanatory Background Document on in vitro skin irritation testing* da OCDE (documento explicativo de base dos ensaios de irritação cutânea *in vitro*) antes do desenvolvimento e da validação de métodos *in vitro* similares ou modificados que utilizam epiderme humana reconstruída e de se solicitar a adoção dos mesmos com caráter normativo (23).

DEFINIÇÕES

6. As definições utilizadas figuram no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

7. Uma limitação do método de ensaio, demonstrada no estudo de validação (16), reside no facto de não permitir classificar produtos químicos na categoria 3 facultativa do sistema GHS da ONU (irritantes ligeiros) (1). Quando é utilizado como ensaio alternativo parcial, pode ser necessário complementá-lo com ensaios *in vivo*, a fim de caracterizar completamente o potencial de irritação cutânea [(4) e capítulo B.4 do presente anexo]. É sabido que a utilização de pele humana está sujeita a condições e considerações nacionais e internacionais de natureza ética.

8. Este método de ensaio incide na componente *in vitro* da irritação cutânea da estratégia de ensaio sequencial por etapas no domínio da irritação/corrosão dérmica do método B.4 (*Test Guideline* 404 da OCDE) (4). Embora o presente método não forneça informações adequadas sobre corrosão cutânea, importa referir que o método B.40A (*Test Guideline* 431 da OCDE) relativo à corrosão da pele se baseia no mesmo sistema de ensaio de epiderme humana reconstruída, embora utilize outro protocolo (capítulo B.40A). O presente método baseia-se em modelos de epiderme humana reconstruída com queratinócitos humanos, a qual representa, portanto, *in vitro*, o órgão-alvo da espécie em causa. O método cobre ainda, diretamente, a fase inicial do mecanismo de ação/processo inflamatório (lesões celulares e dos tecidos que originam traumatismos localizados) que ocorre na irritação *in vivo*. Durante a validação do método, ensaiou-se uma vasta gama de produtos químicos, contando a base de dados empírica do estudo de validação com 58 produtos químicos (16) (18) (23). O método é aplicável a sólidos, líquidos, semissólidos e ceras. Os líquidos podem ser aquosos ou não e os sólidos podem ser solúveis ou insolúveis em água. Sempre que possível, os sólidos devem ser finamente moídos antes da aplicação. Não é necessário nenhum outro pré-tratamento das amostras. O estudo de validação ainda não incidiu em gases e aerossóis (24). Embora se admita que uns e outros possam ser ensaiados recorrendo à tecnologia da epiderme humana reconstruída, a versão atual do método não está vocacionada para ensaios de gases nem de aerossóis. É também de referir que os produtos químicos fortemente corados podem interferir com as medições de viabilidade celular, sendo necessário utilizar controlos corretivos adequados (ver os pontos 24 a 26).

9. Quando a classificação do produto químico em estudo é inequívoca, é normalmente suficiente uma série de ensaios constituída por um triplicado dos tecidos. Porém, nos casos inconclusivos (por exemplo, medições discordantes dos replicados e/ou percentagem de viabilidade média igual a 50 % ± 5 %), é de ponderar a realização de uma segunda série de ensaios, bem como de uma terceira se os resultados das duas primeiras séries forem discordantes.

▼M3

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

10. O produto químico em estudo é aplicado localmente num modelo tridimensional de epiderme humana reconstruída, constituído por queratinócitos de epiderme humana não transformados, cultivados de modo a formarem um modelo de epiderme humana com várias camadas e altamente diferenciado. O modelo é constituído por uma camada basal, uma camada espinhosa e uma camada granulosa organizadas e por um *stratum corneum* em várias camadas, com uma estrutura lipídica lamelar intercelular representativa das principais classes de lípidos, semelhante ao observado *in vivo*.

11. A irritação cutânea induzida por produtos químicos, manifestada por eritema e edema, resulta de uma série de acontecimentos iniciada com a penetração do *stratum corneum* e lesão das camadas subjacentes de queratinócitos. Ao começarem a morrer, os queratinócitos libertam mediadores que desencadeiam o processo inflamatório, o qual afeta as células da derme, em especial as células estromáticas e endoteliais. A dilatação e permeabilidade crescente das células endoteliais origina o eritema e o edema observados (24). Os métodos que utilizam epiderme humana reconstruída medem os acontecimentos iniciais deste processo.

12. A viabilidade celular nos modelos de epiderme humana reconstruída é medida pela conversão enzimática do corante vital MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolilo, n.º CAS 298-93-1 – num sal azul de formazano, que é determinado quantitativamente depois de extraído dos tecidos (25). Os produtos químicos irritantes são identificadas com base na sua capacidade de redução da viabilidade celular para valores inferiores a limites definidos (≤ 50 % no caso das substâncias irritantes classificadas na categoria 2 dos sistemas GHS da ONU e CRE da UE). Consoante o quadro regulamentar no qual os resultados obtidos por este método sejam utilizados, os produtos químicos a que estejam associadas viabilidades celulares acima do limite definido podem ser considerados não-irritantes (> 50 %, nenhuma categoria).

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

13. Antes de passarem a utilizar, por rotina, algum dos três métodos validados em conformidade com o presente método de ensaio, cada laboratório terá de demonstrar a sua competência técnica, utilizando para o efeito os 10 produtos químicos de referência indicados no quadro 1. No caso de métodos similares ao presente método ou de modificações de algum dos três métodos validados, é necessário cumprir as normas de desempenho especificadas no apêndice 2 antes de utilizar o método em causa em ensaios normativos.

14. No âmbito da confirmação de competência, recomenda-se que o utilizador verifique, após a receção dos tecidos, as propriedades de barreira dos mesmos especificadas pelo fabricante do modelo de epiderme humana reconstruída. Este aspeto é especialmente importante se os tecidos forem expedidos a longas distâncias ou demorarem muito tempo a chegar. A partir do momento em que o método esteja implantado e tenha sido demonstrada competência para utilizá-lo, não é necessário efetuar por rotina a referida verificação. Recomenda-se, contudo, que, ao utilizar um método por rotina, se continue a avaliar periodicamente as propriedades de barreira.

Quadro 1

Produtos químicos de referência [1]

Produto químico	N.º CAS	Pontuação *in vivo* [2]	Estado	Categoria GHS da ONU/CRE da UE
Ácido naftalenoacético	86-87-3	0	Sólido	Nenhuma
Isopropanol	67-63-0	0,3	Líquido	Nenhuma

▼M3

Produto químico	N.º CAS	Pontuação *in vivo* (2)	Estado	Categoria GHS da ONU/CRE da UE
Estearato de metilo	112-61-8	1	Sólido	Nenhuma
Butirato de heptilo	5870-93-9	1,7	Líquido	Nenhuma (*categoria 3 facultativa*) (3), (4)
Salicilato de hexilo	6259-76-3	2	Líquido	Nenhuma (*categoria 3 facultativa*) (3), (4)
Ciclamenaldeído	103-95-7	2,3	Líquido	Categoria 2
1-Bromo-hexano	111-25-1	2,7	Líquido	Categoria 2
Hidróxido de potássio (solução aquosa a 5 %)	1310-58-3	3	Líquido	Categoria 2
1-Metil3-fenil1-piperazina	5271-27-2	3,3	Sólido	Categoria 2
Heptanal	111-71-7	3,4	Líquido	Categoria 2

(1) Os produtos químicos de referência constantes desta lista fazem parte da série utilizada no estudo de validação.
(2) Pontuação *in vivo* de acordo com o método B.4 e com o *Test Guideline* 404 da OCDE (4).
(3) No âmbito do presente método, a categoria 3 facultativa do sistema GHS da ONU (irritantes ligeiros) (1) é referida como «nenhuma categoria».
(4) A categoria 3 facultativa do sistema GHS da ONU não é aplicável no âmbito do sistema CRE da UE.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

15. Descrevem-se a seguir os componentes e procedimentos de um método baseado em epiderme humana reconstruída para avaliação da irritação cutânea. O modelo de epiderme humana reconstruída pode ser preparado no laboratório ou obtido no comércio. Estão disponíveis procedimentos operacionais normalizados para o EpiSkin™, o EpiDerm™ SIT (EPI-200) e o SkinEthic™ RHE (26)(27)(28). Na realização dos ensaios deve ter-se em conta o seguinte:

Componentes do método de ensaio de epiderme humana reconstruída

Condições gerais

16. Na reconstrução do epitélio, utilizam-se queratinócitos humanos não transformados. Devem estar presentes várias camadas de células epiteliais viáveis (camada basal, camada espinhosa, camada granulosa), sob um *stratum corneum* funcional. Este deve ter várias camadas e possuir um perfil lipídico que permita estabelecer uma barreira funcional suficientemente robusta para resistir a uma penetração rápida de produtos químicos marcadores citotóxicos, por exemplo, dodecilsulfato de sódio (SDS) ou Triton X-100. A função de barreira deve ser demonstrada e pode ser avaliada determinando a concentração à qual o produto químico marcador reduz a viabilidade dos tecidos em 50 % (CI_{50}), após um tempo de exposição fixo, ou determinando o tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade celular em 50 % (TE_{50}), após ser aplicada uma dada concentração fixa do produto químico marcador. As propriedades de contenção do modelo de epiderme humana reconstruída devem impedir a passagem de matéria para o tecido viável por contorno do *stratum corneum*, que redundaria numa modelação deficiente da exposição cutânea. O modelo de epiderme humana reconstruída não deve estar contaminado por bactérias, vírus, micoplasmas ou fungos.

▼M3

Condições funcionais

Viabilidade

17. Para quantificar a viabilidade recorre-se ao método do MTT (25). Os utilizadores do modelo de epiderme humana reconstruída devem garantir que cada lote do modelo utilizado preenche os critérios definidos para o controlo negativo. A densidade ótica do solvente de extração isolado deve ser suficientemente baixa (< 0,1). As entidades que desenvolvem/fornecem o modelo de epiderme humana reconstruída estabeleceram intervalos de aceitabilidade (limites superior e inferior) para os valores de densidade ótica dos controlos negativos (nas condições do método de ensaio de irritação cutânea), que se indicam no quadro 2 para os três métodos validados. Os tecidos tratados com o produto químico de controlo negativo devem, comprovadamente, manter-se estáveis em cultura durante todo o período de exposição do ensaio (medições de viabilidade semelhantes).

Quadro 2

Intervalos de aceitabilidade para os valores de densidade ótica dos controlos negativos

	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Função de barreira

18. O *stratum corneum* e a sua composição lipídica devem ser suficientes para resistir a uma penetração rápida de produtos químicos marcadores citotóxicos (por exemplo, SDS ou Triton X-100), estimada com base na CI_{50} ou no TE_{50} (quadro 3).

Morfologia

19. O exame histológico do modelo de epiderme humana reconstruída deve revelar uma estrutura de epiderme humana (incluindo um *stratum corneum* com várias camadas).

Reprodutibilidade

20. Os resultados obtidos por aplicação do método ao produto químico de controlo positivo e aos controlos negativos devem mostrar-se continuadamente reprodutíveis.

Controlo de qualidade

21. As entidades que desenvolvem/fornecem o modelo de epiderme humana reconstruída devem assegurar e demonstrar que todos os lotes do modelo preenchem os critérios de liberação da produção estabelecidos, dos quais os mais importantes são os de *viabilidade* (ponto 17), *função de barreira* (ponto 18) e *morfologia* (ponto 19). Estes dados devem ser facultados aos utilizadores do método, para que estes possam fazer constar tais informações dos seus relatórios. A entidade que desenvolve/fornece o modelo de epiderme humana reconstruída (ou o investigador, quando utilize modelo próprio) deve definir um intervalo de aceitabilidade (limites inferior e superior) para a CI_{50} ou o TE_{50}. Apenas podem ser utilizados com fiabilidade na previsão de classificações de irritação resultados obtidos com tecidos que possuam as características exigidas. A título de exemplo, apresentam-se no quadro 3 os intervalos de aceitabilidade dos três métodos validados.

▼M3

Quadro 3

Exemplos de critérios de controlo de qualidade para a liberação de lotes

	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
EpiSkin™ (SM) (18 horas de tratamento com SDS)(26)	CI_{50} = 1,0 mg/ml	CI_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (Triton X-100 a 1 %)(27)	TE_{50} = 4,8 h	TE_{50} = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (Triton X-100 a 1 %)(28)	TE_{50} = 4,0 h	TE_{50} = 9,0 h

Aplicação das substâncias em estudo e de controlo

22. Devem utilizar-se em cada série pelo menos três replicados de cada produto químico em estudo e dos produtos químicos de controlo. Tanto no caso das substâncias líquidas como das substâncias sólidas, deve aplicar-se uma quantidade do produto químico em estudo suficiente para cobrir uniformemente a superfície da epiderme, evitando uma dose infinita, ou seja, no mínimo 25 µl/cm^2 ou 25 mg/cm^2. No caso dos sólidos, a superfície da epiderme deve ser humidificada, com água desionizada ou destilada, antes da aplicação, para melhorar o contacto entre o produto químico em estudo e a superfície epidérmica. Sempre que possível, os sólidos devem ser ensaiados na forma de pó fino. Após o período de exposição, o produto químico em estudo deve ser cuidadosamente removido da superfície da epiderme, por lavagem com uma solução-tampão aquosa ou uma solução a 0,9 % de NaCl. Consoante o método de epiderme humana reconstruída que for utilizado, dos três validados, o período de exposição pode variar entre 15 minutos e 60 minutos e a temperatura de incubação entre 20 °C e 37 °C. Estes períodos de exposição e temperaturas estão otimizados para cada método de epiderme humana reconstruída e refletem as diferentes propriedades intrínsecas dos métodos – ver os procedimentos operacionais normalizados dos métodos em (26) (27) (28).

23. Devem utilizar-se em cada série de ensaios produtos químicos de controlo negativos e positivos, para demonstrar que a viabilidade (com o controlo negativo), a função de barreira e a sensibilidade resultante (com o controlo positivo) dos tecidos se situam no intervalo histórico de aceitabilidade definido. Sugere-se a utilização de solução aquosa a 5 % de SDS como produto químico de controlo positivo. Como produto químico de controlo negativo, sugere-se a utilização de água ou de solução-tampão de fosfato (PBS).

Medição da viabilidade celular

24. O elemento mais importante do procedimento de ensaio é que as medições de viabilidade não sejam efetuadas imediatamente após a exposição aos produtos químicos em estudo, mas sim após um período suficientemente longo de incubação dos tecidos lavados em meio fresco, depois do tratamento. Esse período permite, tanto a recuperação de efeitos citotóxicos fracos, como a manifestação de efeitos citotóxicos claros. Na fase de otimização do ensaio (11) (12) (13) (14) (15), verificou-se que a duração ótima do período de incubação depois do tratamento é de 42 horas.

25. Para medir a viabilidade celular no âmbito do presente método, deve utilizar-se o método quantitativo validado do MTT, que é compatível com a arquitetura tridimensional dos tecidos. Coloca-se a amostra destes numa solução de MTT de concentração apropriada (por exemplo, 0,3-1 mg/ml), durante três horas. O precipitado azul de formazano é depois extraído dos tecidos com um solvente (por exemplo, isopropanol ou isopropanol acidificado), determinando-se a concentração de formazano por medição da densidade ótica ao comprimento de onda de 570 nm, utilizando um filtro de banda passante de ± 30 nm, no máximo.

▼M3

26. As propriedades óticas do produto químico em estudo, ou a reação química deste com o MTT, podem interferir no ensaio, gerando estimativas erróneas de viabilidade (caso o produto químico em estudo evite ou reverta a coloração ou produza coloração). Isto pode suceder se o produto químico em estudo não for completamente removido dos tecidos por lavagem ou se penetrar na epiderme. Se o produto químico em estudo agir diretamente no MTT (redutor do MTT), for naturalmente corado ou adquirir coloração durante o tratamento dos tecidos, devem ser utilizados produtos químicos de controlo suplementares, que permitam detetar interferências do produto químico em estudo na técnica de medição da viabilidade e corrigir esse efeito. Os procedimentos operacionais normalizados descrevem pormenorizadamente, para os três métodos validados, o modo como podem corrigir-se a redução direta do MTT e as interferências de agentes corantes (26) (27) (28).

Critérios de aceitabilidade

27. Em cada método que utilize lotes válidos do modelo de epiderme humana reconstruída (ver o ponto 21), a densidade ótica dos tecidos tratados com o produto químico de controlo negativo deve refletir a qualidade de tecidos sujeitos a expedição, às etapas de receção e a todos os processos do protocolo. A densidade ótica dos produtos químicos de controlo não deve ser inferior aos limites históricos estabelecidos. Analogamente, os tecidos tratados com o produto químico de controlo positivo – ou seja, com solução aquosa a 5 % de SDS – devem manifestar a capacidade de reação dos tecidos ao produto químico irritante nas condições do método de ensaio (26) (27) (28). Devem definir-se estimativas conexas adequadas da variabilidade dos resultados dos replicados de tecidos (por exemplo, se se recorrer a desvios-padrão, devem estar dentro do intervalo de tolerância de 95 % calculado em teste assimétrico a partir dos dados históricos; para o método de referência validado, o desvio-padrão é inferior a 18 %).

Interpretação dos resultados e modelo de previsão

28. Os valores de densidade ótica obtidos para cada produto químico em estudo podem ser utilizados para calcular a percentagem de viabilidade normalizada em relação à correspondente ao controlo negativo, que é fixada em 100 %. Importa definir claramente e documentar a percentagem de viabilidade celular que estabelece a diferenciação entre os produtos químicos em estudo irritantes e não classificados e o(s) método(s) estatístico(s) utilizado(s) para avaliar os resultados e identificar os produtos químicos irritantes, devendo ainda demonstrar-se que são adequados. Indicam-se a seguir os valores limite de diferenciação para a previsão de efeitos irritantes:

— Considera-se o produto químico em estudo irritante da pele, da categoria 2 dos sistema GHS da ONU/CRE da UE, se a viabilidade dos tecidos depois da exposição e da incubação subsequente ao tratamento for inferior ou igual a 50 %.

— Consoante o quadro regulamentar no qual os resultados deste método de ensaio forem utilizados, o produto químico em estudo pode ser considerado não irritante da pele, correspondendo-lhe a classificação de «nenhuma categoria» nos termos dos sistema GHS da ONU/CRE da UE, se a viabilidade dos tecidos depois da exposição e da incubação subsequente ao tratamento for superior a (>) 50 %.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

29. Para cada série de ensaios, devem ser apresentados num quadro os dados respeitantes a cada replicado de tecidos (por exemplo, valores de densidade ótica e percentagens de viabilidade celular calculadas para cada produto químico em estudo, bem como a classificação correspondente), incluindo os dados relativos às repetições de ensaios eventualmente efetuadas. Deve igualmente ser indicada para cada série de ensaios a média ± desvio-padrão. Devem referir-se ainda, para cada produto químico estudado, as interações observadas com o MTT e se é corado.

▼**M3**

Relatório do ensaio

30. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produtos químicos em estudo e de controlo:

— Denominação ou denominações químicas – denominação e número CAS, denominação e número CE, etc. –, se forem conhecidas;

— Grau de pureza e composição do produto químico (em percentagem ponderal);

— Propriedades fisico-químicas (por exemplo, estado, estabilidade, volatilidade, pH e hidrossolubilidade, se forem conhecidos) pertinentes para o estudo;

— Pré-tratamento dos produtos químicos em estudo/de controlo, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Condições de armazenagem.

Justificação do modelo de epiderme humana reconstruída e do protocolo utilizados.

Condições de ensaio:

— Sistema celular utilizado;

— Informações completas que substanciem o modelo específico de epiderme humana reconstruída utilizado, incluindo dados sobre o desempenho do mesmo, por exemplo:

  i) viabilidade,

  ii) função de barreira,

  iii) morfologia,

  iv) reprodutibilidade e previsibilidade,

  v) controlo de qualidade do modelo;

— Elementos sobre o procedimento de ensaio seguido;

— Dosagens de ensaio utilizadas e duração da exposição e do período de incubação depois do tratamento;

— Descrição de eventuais modificações na execução do ensaio;

— Referência a dados históricos sobre o modelo, por exemplo:

  i) aceitabilidade dos dados de controlo de qualidade relativamente a dados históricos de lotes,

  ii) aceitabilidade dos valores obtidos para os produtos químicos de controlo positivo e negativo relativamente a médias e intervalos correspondentes a tais produtos;

— Descrição dos critérios de avaliação utilizados, incluindo a justificação do(s) ponto(s) de diferenciação selecionado(s) para o modelo preditivo;

— Referência a dados históricos de controlo.

▼M3

Resultados:

— Quadro dos dados correspondentes a cada produto químico estudado, por série de ensaios e medição de replicados;

— Indicação dos controlos utilizados no caso dos redutores diretos do MTT e/ou dos produtos químicos estudados que apresentem coloração;

— Descrição de outros efeitos eventualmente observados.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

REFERÊNCIAS

(1) UN (2009). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Third revised edition. ONU, Nova Iorque e Genebra. Disponível em: [http://www.unece.org/trans/danger/publi//ghs/ghs_rev03/03files_e.html].

(2) CE-ECVAM (2009). Statement on the «Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards». Publicado pelo ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 de abril de 2009. Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(3) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006, JO L 353 de 31.12.2008, p. 1.

(4) OCDE (2004). Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(5) OCDE (2004). *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(6) OCDE (2004). *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(7) OCDE (2006). *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(8) CE-ECVAM (2009). Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE). Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(9) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M., Botham, P. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team. *Toxicol. in Vitro*, 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C., Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. *Toxicol. in Vitro*, 16, 765–770.

▼M3

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B., Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests. *ALTEX*, 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D., Spielmann, H. (2005). The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test. *ATLA*, 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R., Rubinsteen, G. (2005). The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process. *ATLA*, 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C., Worth, A. (2002). Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2. *ATLA*, 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I., Zuang, V. (2007). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test. *ATLA*, 35, 559-601.

(17) Hoffmann, S. (2006). ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1-α. Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I., Zuang, V. (2007). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals. *ATLA*, 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E., Leclaire, J. (2007). *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy – Results and performances with 184 cosmetic ingredients. *AATEX*, 14, 351-358.

(20) CE-ECVAM (2007). Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 de abril de 2007. Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(21) CE-ECVAM (2007). Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(22) CE-ECVAM (2008). Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 de novembro de 2008. Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(23) OCDE (2010). Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html].

(24) Welss, T., Basketter, D.A., Schröder, K.R. (2004). *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol. in Vitro*, 18, 231-243.

▼**M3**

(25) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.

(26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (fevereiro de 2009). ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min – 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (revisto em março de 2009). Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), for use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (fevereiro de 2009). SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Disponível em: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

(29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., Maibach, H.I. (1995). Irritant contact dermatitis, *in* Practical Contact Dermatitis, p. 7-18 (Ed. Guin. J. D.). Mc Graw-Hill, Nova Iorque.

(30) Diretiva 2001/59/CE da Comissão, de 6 de agosto de 2001, que adapta ao progresso técnico pela vigésima oitava vez a Diretiva 67/548/CEE do Conselho relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas (JO L 225 de 21.8.2001, p. 1).

(31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P., Robinson, M.K. (2004). Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis*, 51, 1-4.

(32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M., Kandarova, H. (2007). Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data. *ALTEX*, 14, 359-365.

(33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M., Kandárová, H. (2010). Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data. *Contact Dermatitis*, 62, 109-116.

▼M3

Apêndice 1

Definições

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (9).

Viabilidade celular: Parâmetro que mede a atividade total de uma população celular (por exemplo, em termos de capacidade das desidrogenases mitocondriais celulares para reduzirem o corante vital MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol2--il)-2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolilo); consoante o indicador determinado e o tipo de ensaio realizado, é possível correlacionar a viabilidade celular com o número total de células vivas e/ou a vitalidade dessas células.

Concordância: Mede o desempenho do método de ensaio no caso dos métodos cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e constitui um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «exatidão» são utilizados indistintamente; é definido como a proporção dos produtos químicos ensaiados que são classificados corretamente positivos ou negativos (9).

TE_{50}: Pode ser estimado determinando o tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade celular em 50 %, após aplicação de uma dada concentração fixa de um marcador químico; ver também CI_{50}.

Sistema CRE da UE (Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas: Aplica na União Europeia o sistema GHS da ONU de classificação e rotulagem de produtos químicos (substâncias e misturas) (3).

GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, da Organização das Nações Unidas – ONU): Sistema (designado em inglês por «*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*») que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência, etc.) e do ambiente (1).

CI_{50}: Pode ser estimada determinando a concentração à qual um produto químico marcador reduz a viabilidade dos tecidos em 50 % (CI_{50}), após um tempo de exposição fixo; ver também TE_{50}.

Dose infinita: Quantidade do produto químico em estudo aplicado à epiderme que excede a quantidade necessária para recobrir completa e uniformemente a superfície epidérmica.

Ensaio «me-too»: Expressão coloquial em inglês que designa um método de ensaio estrutural e funcionalmente similar a um método de referência validado e aceite. Um método com tais características é candidato a validação por similitude. O termo é sinónimo de «método de ensaio similar» (9).

Normas de desempenho: Normas associadas a um método de ensaio validado com base nas quais pode ser avaliada a comparabilidade de um método de ensaio proposto que lhe seja funcional e mecanisticamente similar. Integram essas normas: i) os componentes essenciais do método de ensaio, ii) uma lista mínima de produtos químicos de referência, selecionados entre os produtos químicos utilizados para demonstrar a aceitabilidade do desempenho do método de ensaio validado e iii) os níveis de exatidão e de fiabilidade, comparáveis aos obtidos com o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve evidenciar ao ser avaliado utilizando a lista mínima de produtos químicos de referência (9).

▼**M3**

Produto químico de referência: Produto químico selecionado para ser utilizado no processo de validação, cujas respostas aos sistemas de ensaio de referência *in vitro* ou *in vivo*, ou na espécie em causa, já são conhecidas. Estes produtos químicos devem ser representativos das classes de produtos químicos para as quais está prevista a utilização do método de ensaio e devem traduzir toda a gama de respostas (forte, fraca, negativa) que são de esperar dos produtos químicos aos quais o método se destina. Fases diferentes do processo de validação, métodos de ensaio diferentes e utilizações diferentes do mesmo ensaio podem exigir séries diferentes de produtos químicos de referência (9).

Adequação: Relação do ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (9).

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (9).

Ensaio alternativo: Ensaio destinado a substituir um ensaio de rotina aceite para identificação de perigos e/ou avaliação de riscos, que se concluiu proporcionar proteção equivalente, ou melhorar a proteção, da saúde pública e animal ou do ambiente, consoante o caso, comparativamente ao ensaio de rotina aceite, no que respeita a todos os produtos químicos e situações de ensaio possíveis (9).

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos em estudo positivos/ativos que são corretamente classificadas pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (9).

Irritação cutânea: Produção de danos reversíveis na pele por aplicação de um produto químico em estudo durante um máximo de quatro horas. A irritação cutânea é uma reação local, não imunogénica, que surge pouco depois do estímulo (29). A sua característica principal é a reversibilidade do processo, no qual se produzem reações inflamatórias e surge a maior parte dos sinais clínicos característicos das irritações associadas a processos inflamatórios (eritema, edema, prurido e dor).

Especificidade: Proporção dos produtos químicos em estudo negativos/inativos que são corretamente classificadas pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (9).

Estratégia de ensaio sequencial por etapas: Utilização sequencial de vários métodos de ensaio num ensaio. A escolha do método de ensaio a utilizar em cada etapa da sequência é decidida com base nos resultados obtidos na etapa de ensaio anterior (9).

Produto químico em estudo (ou substância química em estudo): Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

▼M3

Apêndice 2

Normas de desempenho para avaliação de métodos similares ou modificados propostos para ensaios *in vitro* de irritação cutânea em epiderme humana reconstruída

INTRODUÇÃO

1. O objetivo das normas de desempenho consiste em comunicar os termos com base nos quais é possível determinar se um método novo, sujeito ou não a direitos de propriedade (direitos de autor, marca comercial ou registo), é suficientemente exato e fiável para certas finalidades de ensaio. Estas normas baseiam-se em métodos de ensaio validados e aceites e podem ser utilizadas para avaliar a fiabilidade e exatidão de métodos análogos (designados coloquialmente em inglês por «métodos "*me-too*" »), baseados em princípios científicos semelhantes e que medem ou preveem o mesmo efeito biológico ou tóxico (9).

2. Antes da adoção de métodos modificados (ou seja, aperfeiçoamentos a métodos aprovados), deve avaliar-se o efeito das alterações propostas no desempenho do ensaio e em que medida essas alterações afetam as informações disponíveis para os outros componentes do processo de validação. Em função do número e da natureza das alterações propostas, dos dados de que se disponha e da documentação de apoio às alterações em causa, estas devem ser sujeitas a um processo de validação idêntico ao descrito para um novo ensaio ou, se for caso disso, a uma avaliação limitada de fiabilidade e adequação com base em normas de desempenho estabelecidas (9).

3. Os métodos similares («*me-too*») a algum dos três métodos validados – EpiSkin™ (método de referência validado), EpiDerm™ SIT (EPI-200) e SkinEthic™ RHE] –, ou as modificações destes, cuja utilização no âmbito do presente método de ensaio seja proposta, devem ser avaliados com vista à determinação da sua fiabilidade e exatidão, utilizando produtos químicos representativos de toda a gama da escala de irritação de Draize. Na sua avaliação por recurso aos 20 produtos químicos de referência recomendados nas normas de desempenho (quadro 1), os métodos de ensaio similares ou modificados propostos devem exibir valores de fiabilidade e exatidão comparáveis aos do método de referência validado, ou melhores do que os deste (quadro 2) (2) (16). Os valores de fiabilidade e de exatidão pretendidos figuram nos pontos 8 a 12 do presente apêndice. Fazem parte da lista produtos químicos não classificados (rubrica «nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU/CRE da UE) e classificados (categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE da UE), representativos de diversas classes químicas, para que a fiabilidade e a exatidão (sensibilidade, especificidade e exatidão global) do método proposto possam ser comparadas com as do método de referência validado. Antes de se utilizar o método para o ensaio de novos produtos químicos, há que determinar a sua fiabilidade e a sua capacidade para identificar corretamente produtos químicos irritantes da categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE da UE e – consoante o quadro regulamentar a que se destinem os dados – também a sua capacidade para identificar corretamente produtos químicos a que corresponda a classificação «nenhuma categoria» do sistema GHS da ONU/CRE da UE.

4. Estas normas baseiam-se nas normas de desempenho da UE (ECVAM) (8), atualizadas em função dos sistemas de classificação e rotulagem GHS da ONU e CRE da UE (1) (3). As normas de desempenho originais foram definidas após o estudo de validação (21) e baseiam-se no sistema de classificação da UE estabelecido na Diretiva 2001/59/CE da Comissão, de 6 de agosto de 2001, que adapta ao progresso técnico pela vigésima oitava vez a Diretiva 67/548/CEE do Conselho, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas ([1]). Uma vez que, entre

([1]) JO L 225 de 21.8.2001, p. 1.

▼M3

a conclusão do estudo de validação e o termo da elaboração do presente método, se adotou o sistema GHS da ONU para a classificação e a rotulagem na UE (sistema CRE da UE) (3), atualizaram-se as normas de desempenho (8). A atualização incide, sobretudo, i) na lista de produtos químicos de referência prevista nas normas de desempenho e ii) nos valores definidos de fiabilidade e exatidão (2) (23).

NORMAS DE DESEMPENHO PARA MÉTODOS DE ENSAIO *IN VITRO* DE IRRITAÇÃO CUTÂNEA EM EPIDERME HUMANA RECONSTRUÍDA

5. As normas de desempenho compreendem os seguintes três elementos principais:

I) Componentes essenciais do método de ensaio

II) Lista mínima de produtos químicos de referência

III) Valores definidos de fiabilidade e de exatidão

I) **Componentes essenciais do método de ensaio**

6. Trata-se dos elementos essenciais, de natureza estrutural, funcional e processual, dos métodos validados, que têm de constar do protocolo dos métodos propostos, mecanística e funcionalmente similares ou modificados. Estes componentes incluem as especificidades do método, elementos críticos do procedimento de ensaio e medidas de controlo de qualidade. A incorporação dos componentes essenciais do método de ensaio contribui para garantir que um método similar ou modificado proposto se baseia em conceitos idênticos aos do método de referência validado (9). Nos pontos 16 a 21 deste método, descrevem-se em pormenor os componentes essenciais do método de ensaio. Na realização dos ensaios deve ter-se em conta o seguinte:

— Condições gerais (ponto 16).

— Condições funcionais, que incluem:

— viabilidade (ponto 17),

— função de barreira (ponto 18),

— morfologia (ponto 19),

— reprodutibilidade (ponto 20),

— controlo de qualidade (ponto 21).

II) **Lista mínima de produtos químicos de referência**

7. Utilizam-se produtos químicos de referência para determinar se a fiabilidade e a exatidão de um método de ensaio similar ou modificado proposto, que comprovadamente tenha uma semelhança suficiente, em termos estruturais e funcionais, ao método de referência validado, ou que constitua uma modificação menor de um dos três métodos validados, são comparáveis ou melhores do que as do método de referência validado (2) (8) (16) (23). Os 20 produtos químicos de referência recomendados que constam do quadro 1 são representativos de várias classes químicas (categorias químicas definidas com base em grupos funcionais) e de toda a gama da escala de irritação de Draize (de não irritante a fortemente irritante). Os produtos químicos constantes da lista compreendem 10 da categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE da UE e 10 «não classificados», dos quais três pertencentes à categoria 3 facultativa do sistema GHS da ONU. No âmbito do presente método, a categoria 3 facultativa é referida como «nenhuma categoria». Os produtos químicos que constam do quadro 1 foram selecionados entre os utilizados na fase de otimização que se seguiu à pré-validação, bem como no estudo de validação do método de referência, no que respeita aos grupos funcionais e ao estado físico (14) (18). Para avaliar a exatidão e a fiabilidade de métodos similares ou modificados propostos, devem utilizar-se, no mínimo, os produtos químicos de

▼M3

referência; todavia, estes não devem ser utilizados no desenvolvimento de novos métodos. Se um produto químico constante da lista não estiver disponível, podem utilizar-se outros produtos químicos para os quais se disponha de dados *in vivo* de referência adequados, preferencialmente dos produtos químicos utilizados na fase de otimização que se seguiu à pré-validação ou no estudo de validação do método de referência. Para avaliar melhor a exatidão de um método proposto, podem acrescentar-se à lista mínima de produtos químicos de referência outros produtos químicos, que sejam representativos de outras classes químicas e para os quais se disponha de dados de referência *in vivo* adequados.

Quadro 1

Lista mínima de produtos químicos de referência para quantificação da exatidão e fiabilidade de métodos similares ou modificados de irritação cutânea em epiderme humana reconstruída ([1])**.**

Produto químico	Número CAS	Estado	Pontuação *in vivo*	Categoria no método de referência validado in vitro	Categoria GHS da ONU/CRE da UE, *in vivo*
1-Bromo4-clorobutano	6940-78-9	Líquido	0	Categoria 2	Nenhuma
Ftalato de dietilo	84-66-2	Líquido	0	Nenhuma	Nenhuma
Ácido naftalenoacético	86-87-3	Sólido	0	Nenhuma	Nenhuma
Fenoxiacetato de alilo	7493-74-5	Líquido	0,3	Nenhuma	Nenhuma
Isopropanol	67-63-0	Líquido	0,3	Nenhuma	Nenhuma
4-(Metiltio)benzaldeído	3446-89-7	Líquido	1	Categoria 2	Nenhuma
Estearato de metilo	112-61-8	Sólido	1	Nenhuma	Nenhuma
Butirato de heptilo	5870-93-9	Líquido	1,7	Nenhuma	Nenhuma
Salicilato de hexilo	6259-76-3	Líquido	2	Nenhuma	Nenhuma
Cinamaldeído	104-55-2	Líquido	2	Categoria 2	Nenhuma (*categoria 3 facultativa*) ([3])
1-Decanol ([2])	*112-30-1*	*Líquido*	*2,3*	*Categoria 2*	*Categoria 2*
Ciclamenaldeído	103-95-7	Líquido	2,3	Categoria 2	Categoria 2
1-Bromo-hexano	111-25-1	Líquido	2,7	Categoria 2	Categoria 2
Cloridrato de 2-clorometil3,5-dimetil4-metoxipiridina	86604-75-3	Sólido	2,7	Categoria 2	Categoria 2
Dissulfureto de di-n-*propilo*	*629-19-6*	*Líquido*	*3*	*Nenhuma*	*Categoria 2*
Hidróxido de potássio (solução aquosa a 5 %)	1310-58-3	Líquido	3	Categoria 2	Categoria 2
5-(1,1-Dimetiletil)-2-metilbenzenotiol	7340-90-1	Líquido	3,3	Categoria 2	Categoria 2
1-Metil3-fenil1-piperazina	5271-27-2	Sólido	3,3	Categoria 2	Categoria 2

▼M3

Produto químico	Número CAS	Estado	Pontuação *in vivo*	Categoria no método de referência validado in vitro	Categoria GHS da ONU/CRE da UE, *in vivo*
Heptanal	111-71-7	Líquido	3,4	Categoria 2	Categoria 2
Tetracloroetileno	127-18-4	Líquido	4	Categoria 2	Categoria 2

([1]) Critérios de seleção dos produtos químicos: i) disponibilidade comercial, ii) representatividade no que respeita a toda a gama da escala de irritação de Draize (de não irritante a fortemente irritante), iii) estrutura química bem definida, iv) representatividade ao nível das classes funcionais utilizadas no processo de validação e v) exclusão de perfis extremamente tóxicos (por exemplo, carcinogenicidade ou toxicidade para o aparelho reprodutor) e de custos de eliminação proibitivos.
([2]) Produtos químicos irritantes no coelho, mas comprovadamente não irritantes do ser humano (31) (32) (33).
([3]) No âmbito do sistema GHS da ONU, mas não do sistema CRE da UE.

III) **Valores definidos de fiabilidade e de exatidão**

8. A fim de se determinar a fiabilidade e adequação de métodos similares ou modificados propostos, a transferir entre laboratórios, é necessário ensaiar os 20 produtos químicos de referência constantes do quadro 1 em, pelo menos, três laboratórios. Todavia, se o método proposto se destinar a ser utilizado apenas num laboratório, a validação não carece do ensaio em vários laboratórios. É, no entanto, essencial que os estudos de validação sejam avaliados de forma independente por organismos de validação reconhecidos a nível internacional, em observância das diretrizes internacionais (9). É necessário ensaiar em cada laboratório os 20 produtos químicos de referência, em três séries de ensaios independentes, com lotes de tecidos diferentes e suficientemente intervalados em termos cronológicos. Cada série consiste no ensaio em paralelo de, pelo menos, três replicados de tecidos por produto químico, controlo negativo e controlo positivo.

9. O cálculo dos valores de fiabilidade e de exatidão do método proposto deve ter em conta os quatro critérios a seguir indicados, a fim de garantir o cálculo coerente dos valores de fiabilidade e de adequação do modo previamente definido.

   1. No cálculo da capacidade de previsão (exatidão) e da variabilidade intra e interlaboratoriais do método, apenas podem utilizar-se dados de séries de ensaios completas.

   2. Para se estabelecer a classificação final da cada produto químico de referência em cada laboratório participante, utiliza-se o valor médio de viabilidade correspondente aos vários ensaios das séries de ensaios completas.

   3. No cálculo da variabilidade interlaboratorial do método, apenas podem ser utilizados dados correspondentes a produtos químicos para os quais tenham sido completadas séries de ensaios em todos os laboratórios participantes.

   4. O cálculo dos valores de exatidão é efetuado com base nas previsões efetuadas em cada laboratório participante, para os 20 produtos químicos de referência.

   Neste contexto, entende-se por «**série de ensaios**» três ensaios independentes efetuados num laboratório a um produto químico em estudo. Entende-se por «**série de ensaios completa**» uma sequência de três ensaios válidos, efetuada num laboratório, a um produto químico em estudo. Significa isto que um ensaio inválido invalida toda a série de três ensaios efetuados em sequência.

Reprodutibilidade intralaboratorial

10. Ao determinar a reprodutibilidade intralaboratorial num laboratório, a concordância, nesse laboratório, das classificações (categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE da UE e nenhuma categoria) obtidas em séries de ensaios diferentes e independentes realizadas aos 20 produtos químicos de referência deve ser igual ou superior a 90 %.

▼M3

Reprodutibilidade interlaboratorial

11. Se o método de ensaio proposto se destinar a ser utilizado num único laboratório, não é necessário determinar a reprodutibilidade interlaboratorial. No caso dos métodos a transferir para outros laboratórios, a concordância entre – de preferência – pelo menos três laboratórios nas classificações (categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE da UE e nenhuma categoria) obtidas em séries de ensaios diferentes e independentes realizadas aos 20 produtos químicos de referência deve ser igual ou superior a 80 %.

Capacidade de previsão (exatidão)

12. A exatidão (sensibilidade, especificidade e exatidão global) do método similar ou modificado proposto deve ser comparável à do método de referência validado ou melhor do que a deste, tendo em conta dados adicionais sobre a adequação à espécie em causa (quadro 2). A sensibilidade deve ser igual ou superior a 80 % (2) (8) (23). Todavia, a sensibilidade do método *in vitro* proposto é objeto de uma restrição suplementar específica: a classificação «nenhuma categoria» só pode ser erradamente atribuída por mais de um laboratório participante a dois produtos químicos da categoria 2 *in vivo* (*1-decanol* e *dissulfureto de di-n-propilo*). A especificidade deve ser igual ou superior a 70 % (2) (8) (23). Não há outras restrições à especificidade do método *in vitro* proposto, ou seja, qualquer laboratório participante pode classificar erradamente um produto químico na rubrica «nenhuma categoria»*in vivo*, desde que a especificidade final do método de ensaio se situe no intervalo aceitável. A exatidão global deve ser igual ou superior a 75 % (2) (8) (23). Embora a sensibilidade do método de referência validado, calculada para os 20 produtos químicos de referência constantes da lista do quadro 1, seja de 90 %, fixou-se em 80 % a sensibilidade mínima exigida a qualquer método similar ou modificado para que se considere válido, pois tanto o *1-decanol* (produto químico inconclusivo) como o *dissulfureto de di-n-propilo* (falso negativo no método de referência validado) são reconhecidamente não-irritantes para o ser humano (31) (32) (33), apesar de os resultados do ensaio no coelho levarem a considerá-los irritantes. Uma vez que os modelos de epiderme humana reconstruída se baseiam em células humanas, podem considerar ambos os produtos químicos «não-irritantes» (rubrica «nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU/CRE da UE).

Quadro 2

Valores de capacidade de previsão exigidos, em termos de sensibilidade, especificidade e exatidão global, para que um método similar ou modificado seja considerado válido.

Sensibilidade	Especificidade	Exatidão global
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Critérios de aceitação do estudo

13. Pode dar-se o caso de um ou mais ensaios, relativos a um ou mais produtos químicos em estudo, não cumprirem os critérios de aceitação dos ensaios no que respeita ao(s) produto(s) químico(s) em estudo ou de controlo ou não serem aceitáveis por outras razões. Para substituir os dados em falta, é admissível a realização de, no máximo, dois ensaios suplementares («reensaio») por produto químico em estudo. Assim, uma vez que, em caso de reensaio, também é necessário ensaiar em paralelo os produtos químicos de controlo positivo e negativo, pode efetuar-se um máximo de duas séries de ensaios suplementares por cada produto químico em estudo.

14. Pode também dar-se o caso de, mesmo depois do reensaio, não ser possível obter o mínimo de três séries válidas, exigido para cada produto químico estudado, no respeitante a todos os produtos químicos de referência e a todos os laboratórios participantes, daí resultando uma matriz de dados incompleta. Nessa eventualidade, os dados obtidos poderão ser considerados aceitáveis se forem cumpridos os três critérios seguintes:

    1. Foi completada pelo menos uma série de ensaios para cada um dos 20 produtos químicos de referência.

▼**M3**

2. Em todos os laboratórios participantes (no mínimo três), foram completadas, pelo menos, 85 % das séries de ensaios (sendo 20 o número de produtos químicos, admitem-se 3 séries de ensaios inválidas por laboratório).

3. Foram completadas, no mínimo, 90 % de todas as séries de ensaios possíveis em, pelo menos, três laboratórios (sendo 20 o número de produtos químicos ensaiados em 3 laboratórios, admitem-se no total 6 séries de ensaios inválidas).

▼M2

B.47 **MÉTODO DE ENSAIO DE OPACIDADE E PERMEABILIDADE DA CÓRNEA EM BOVINOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUE PRODUZAM CORROSÃO OU FORTE IRRITAÇÃO OCULAR**

INTRODUÇÃO

1. O método de ensaio de opacidade e permeabilidade da córnea em bovinos (BCOP) é um método *in vitro* que, em determinadas circunstâncias e dentro de certos limites, pode ser utilizado para atribuir a substâncias e misturas a classificação de «substância corrosiva ou fortemente irritante ocular» (1) (2) (3). Para efeitos do presente método, considera-se «substância fortemente irritante» uma substância irritante que induz no coelho lesões oculares que permanecem durante pelo menos 21 dias após a aplicação. Embora não esteja validado para substituir completamente o ensaio ocular *in vivo* no coelho, recomenda-se a integração do método BCOP numa estratégia de ensaio por etapas para a classificação e rotulagem regulamentares, dentro do domínio de aplicabilidade especificado (4) (5). Sem necessidade de ensaios complementares no coelho, pode atribuir-se às substâncias e misturas em estudo (6) a classificação de substância corrosiva ou fortemente irritante ocular. Uma substância que dê resultado negativo terá de ser ensaiada no coelho pela estratégia de ensaio sequencial descrita no *Test Guideline 405* da OCDE (7) (capítulo B.5 do presente anexo).

2. Pretende-se na descrição deste método de ensaio explicar o processo utilizado para avaliar o potencial de corrosão ou forte irritação ocular de uma substância, medido pela sua capacidade de indução de opacidade e de aumento de permeabilidade em córneas de bovino isoladas. Medem-se os efeitos tóxicos na córnea do seguinte modo: i) redução da transmissão de luz (opacidade) e ii) aumento da passagem do corante fluoresceína sódica (permeabilidade). Combinam-se os resultados das determinações de opacidade e de permeabilidade da córnea após exposição à substância em estudo, de modo a obter a pontuação de irritação *in vitro* (IVIS) correspondente, que é utilizada para classificar o nível de irritação causado pela substância.

3. Também foram ensaiados pelo método BCOP substâncias irritantes oculares indutoras de lesões que desaparecem em menos de 21 dias, assim como substâncias não-irritantes. A exactidão e a fiabilidade do método BCOP não foram, porém, formalmente avaliadas na aplicação do método a substâncias destas categorias.

4. Estabelecem-se definições no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

5. Este método de ensaio baseia-se no protocolo do método BCOP do ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (8), que foi elaborado no seguimento de um estudo de validação internacional (4) (5) (9) e contou com contributos do ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) e do JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods). O protocolo baseia-se na informação obtida do Institute for In Vitro Sciences (IIVS) e no Protocolo 124 do INVITTOX (10), utilizado no estudo de prevalidação do ensaio BCOP que foi efectuado em 1997--1998 com o patrocínio da Comunidade Europeia. Ambos os protocolos se baseiam na metodologia de ensaio BCOP, descrita pela primeira vez por Gautheron *et al.* (11).

▼M2

6. As limitações identificadas deste método de ensaio decorrem das elevadas taxas de falsos positivos no caso dos álcoois e das cetonas e da elevada taxa de falsos negativos no caso dos sólidos, observadas na base de dados de validação (ver o ponto 44) (5). Excluindo da base de dados as substâncias dessas classes físico-químicas, aumenta substancialmente a exactidão do método BCOP nos sistemas de classificação UE, EPA e GHS (5). Atendendo aos objectivos do ensaio (apenas a identificação de substâncias corrosivas/fortemente irritantes oculares), a taxa de falsos negativos não é um aspecto crítico, pois as substâncias seriam a seguir ensaiadas no coelho ou por outros métodos *in vitro* adequadamente validados, conforme as disposições regulamentares, por recurso a uma estratégia de ensaio sequencial baseada na ponderação da suficiência da prova. Acresce que a base de dados de validação actualmente disponível não permite uma avaliação adequada de algumas classes químicas ou classes de produtos (por exemplo, misturas). Os investigadores podem, no entanto, ponderar o recurso a este método para todos os tipos de matérias (incluindo misturas), aceitando um resultado positivo como um indício de reacção corrosiva ou fortemente irritante ocular. Porém, os resultados positivos obtidos no caso de álcoois ou cetonas devem ser interpretados com cautela, devido ao risco de não serem efectivamente positivos em todos os casos que o indiciem.

7. Na manipulação de olhos e córneas de bovino devem seguir-se as regras e procedimentos estabelecidos no laboratório para a manipulação de matérias de origem animal (tecidos, fluidos biológicos, etc.). Recomenda-se a aplicação das precauções gerais inerentes à prática laboratorial (12).

8. Uma limitação deste método de ensaio é o facto de que, embora tenha em conta alguns efeitos oculares avaliados pelo método de ensaio da irritação ocular no coelho e, em certa medida, a gravidade desses efeitos, não tem em conta as lesões na conjuntiva ou na íris. Por outro lado, embora a reversibilidade das lesões da córnea não possa ser avaliada *per se* no ensaio BCOP, foi proposta, com base em estudos oculares no coelho, a possibilidade de se recorrer à avaliação da profundidade inicial da lesão da córnea para estabelecer uma distinção entre efeitos reversíveis e efeitos irreversíveis (13). Finalmente, o método BCOP não permite avaliar o potencial de toxicidade sistémica associado à exposição ocular.

9. Prosseguem os trabalhos com vista à melhor caracterização da utilidade e das limitações do ensaio BCOP na identificação de matérias não fortemente irritantes ou não-irritantes (ver também o ponto 45). Incentiva-se os utilizadores do método a fornecerem espécimes e/ou dados a organizações de validação, para que seja avaliada formalmente a possibilidade de outras utilizações futuras do método BCOP, designadamente na identificação de matérias não fortemente irritantes e de matérias não-irritantes.

10. Os laboratórios que comecem a utilizar este ensaio devem recorrer às substâncias químicas para demonstração de competência técnica recomendadas no apêndice 2. Antes de apresentarem dados obtidos pelo método BCOP para efeitos da classificação regulamentar de perigosidade, os laboratórios podem recorrer às referidas substâncias para demonstrar a sua competência técnica na execução deste método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

11. O método BCOP assenta num modelo organotípico de manutenção *in vitro* das funções fisiológicas e bioquímicas normais da córnea de bovino por um período curto. Neste método de ensaio, as lesões provocadas pela substância em estudo são avaliadas por meio de medições quantitativas, respectivamente com um opacímetro e um espectrofotómetro de luz visível, das alterações de opacidade e permeabilidade da córnea. Ambas as medições são utilizadas para calcular uma IVIS, com base na qual se atribui uma categoria de classificação de perigo de irritação *in vitro*, utilizada como previsão do potencial de irritação ocular *in vivo* da substância em estudo (ver Critérios de decisão).

▼M2

12. O método BCOP utiliza córneas retiradas de olhos de bovinos acabados de abater. Determina-se quantitativamente a opacidade da córnea medindo a quantidade de luz transmitida através da mesma. Determina-se quantitativamente a permeabilidade da córnea medindo a quantidade do corante fluoresceína sódica, detectada no meio de ensaio da câmara posterior, que atravessa totalmente a córnea. Aplicam-se as substâncias em estudo na superfície epitelial da córnea introduzindo-as na câmara anterior do suporte de córnea. Figura no apêndice 3 uma descrição e um diagrama de um suporte de córnea utilizado no método BCOP. Os suportes de córnea podem ser adquiridos no comércio, de origens diversas, ou podem ser construídos.

Origem e idade dos olhos de bovino e selecção da espécie animal

13. O gado enviado para os matadouros é normalmente abatido para consumo humano ou outras utilizações comerciais. Só podem ser utilizados na colheita de córneas para o método BCOP animais saudáveis considerados adequados para entrarem na cadeia alimentar humana. Dado que o peso dos bovinos é muito variável, consoante a raça, a idade e o sexo, não é recomendado qualquer peso do animal no momento do abate.

14. As córneas podem apresentar variações dimensionais devido à utilização de animais de idades diversas. As córneas de bovinos com mais de oito anos têm geralmente um eixo horizontal superior a 30,5 mm e espessura central (CCT) $\geq$ 1 100 μm; de bovinos com menos de cinco anos, têm geralmente um eixo horizontal inferior a 28,5 mm e CCT $<$ 900 μm (14). Por essa razão, não são habitualmente utilizados olhos de bovinos com mais de 60 meses. Normalmente também não se utilizam olhos de bovinos com menos de doze meses, dado que os olhos se encontram ainda em desenvolvimento e a espessura e o diâmetro da córnea são bastante inferiores aos registados para olhos de gado adulto. Porém, admite-se a utilização de córneas de animais jovens (6 a 12 meses de idade), por haver algumas vantagens, como maior facilidade de obtenção, um intervalo etário estreito e menor perigo de exposição potencial dos trabalhadores à encefalopatia espongiforme bovina (BSE) (15). Dado que seria útil avaliar melhor o efeito da dimensão ou espessura da córnea na reacção a substâncias corrosivas ou irritantes, incentivam-se os utilizadores a indicarem a idade e/ou o peso estimados dos animais de origem das córneas utilizadas no estudo.

Colheita e transporte dos olhos para o laboratório

15. A colheita dos olhos é efectuada por empregados do matadouro. Para minimizar lesões mecânicas ou outros danos aos olhos, estes devem ser retirados das órbitas o mais rapidamente possível depois da morte. Para evitar que os olhos sejam expostos a substâncias potencialmente irritantes, os empregados do matadouro não devem utilizar detergentes na lavagem da cabeça do animal.

16. Utilizando um recipiente de tamanho adequado, mergulham-se os olhos completamente em solução HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) e transportam-se para o laboratório de uma maneira que minimize a deterioração e a contaminação bacteriana. Como são colhidos durante o processo de abate, os olhos podem ser expostos a sangue e outras substâncias biológicas, incluindo bactérias e outros microrganismos. Importa, pois, minimizar o risco de contaminação (por exemplo, mantendo o recipiente dos olhos em gelo fundente, adicionando antibióticos – tais como penicilina a 100 UI/ml e estreptomicina a 100 mg/ml – ao HBSS utilizado para mergulhar os olhos durante o transporte).

▼M2

17. O intervalo entre a colheita dos olhos e a utilização das córneas no método BCOP deve ser mínimo (normalmente os olhos devem ser colhidos e utilizados no mesmo dia) e não deve, comprovadamente, comprometer os resultados do ensaio. Os resultados dos ensaios estão relacionados com os critérios de selecção dos olhos e com as reacções às amostras de controlo positivas e negativas. Os olhos utilizados num ensaio devem ser todos do mesmo grupo de colheita num determinado dia.

Critérios de selecção dos olhos utilizados no método BCOP

18. Uma vez chegados ao laboratório, examinam-se cuidadosamente os olhos para detectar eventuais defeitos, nomeadamente aumento de opacidade, escoriações e neovascularização. Só podem ser utilizadas córneas de olhos sem estes defeitos.

19. Também se avalia a qualidade da córnea em fases posteriores do ensaio. Descartam-se as córneas que, após um período inicial de uma hora para estabelecimento do equilíbrio, apresentem opacidade superior a sete unidades (NOTA: calibrar o opacímetro com os padrões de opacidade utilizados para estabelecer as unidades de opacidade – ver o apêndice 3).

20. Cada grupo de tratamento (substância em estudo e amostras de controlo positivas e negativas correspondentes) é constituído por um mínimo de três olhos. Utilizam-se três córneas para amostras de controlo negativas de córnea no ensaio BCOP. Como as córneas são excisadas do globo ocular e colocadas nas câmaras, há potencial para a formação de artefactos resultantes da manipulação, com incidência nos valores individuais de opacidade e permeabilidade da córnea (incluindo as amostras de controlo negativas). Os valores de opacidade e permeabilidade das córneas das amostras de controlo negativas são utilizados para corrigir os valores de opacidade e permeabilidade da córnea da matéria em estudo e das amostras tratadas para controlo positivo utilizados no cálculo da IVIS.

PROCEDIMENTO

Preparação dos olhos

21. Dissecam-se córneas sem defeitos, deixando uma orla de 2-3 mm de esclerótica, para facilitar o manuseamento, e tomando as precauções necessárias para não danificar o epitélio e o endotélio da córnea. Coloca-se cada córnea num suporte especialmente desenhado, constituído por um compartimento anterior e um compartimento posterior. O primeiro estabelece uma interface com a superfície epitelial da córnea; o segundo, com a superfície endotelial da mesma. Enchem-se as duas câmaras, até transbordar, com Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), previamente aquecido, começando pela câmara posterior e evitando a formação de bolhas. Coloca-se em seguida a dispositivo à temperatura de 32 ± 1 °C durante uma hora, para que as córneas fiquem em equilíbrio com o meio e, tanto quanto possível, readquiram a sua actividade metabólica normal (a temperatura aproximada da superfície da córnea *in vivo* é de 32 °C).

22. Depois de terminado o período previsto para se atingir o equilíbrio, adiciona-se EMEM fresco pré-aquecido a ambas as câmaras e efectua-se a leitura da linha de base de opacidade para cada córnea. Descartam-se as córneas que evidenciem lesões macroscópicas dos tecidos (por exemplo, escoriações, pigmentação ou neovascularização) ou opacidade superior a 7 unidades. Calcula-se a opacidade média de todas as córneas equilibradas. Seleccionam-se para córneas de controlo negativas (ou de controlo do solvente) pelo menos três córneas cujo valor de opacidade seja próximo do valor da mediana de todas as córneas. Distribuem-se a seguir as córneas restantes em dois grupos: córneas a submeter ao tratamento e córneas de controlo positivas.

▼M2

23. Dado que a sua capacidade calorífica é superior à do ar, a água oferece condições de temperatura mais estáveis para incubação. Recomenda-se, portanto, a utilização de um banho-maria para manter o suporte de córnea e o seu conteúdo a 32 ± 1 °C. Admite-se, porém, a utilização de incubadores a ar, tomando as precauções necessárias para manter a temperatura estável (por exemplo, aquecendo previamente os suportes e o meio de ensaio).

Aplicação da substância em estudo

24. Utiliza-se um protocolo de tratamento para líquidos e matérias tensioactivas (sólidas ou líquidas) e outro para sólidos não-tensioactivos.

25. Os líquidos são ensaiados sem diluição; as matérias tensioactivas são ensaiadas à concentração de 10 % (m/v) numa solução a 0,9 % de cloreto de sódio, em água destilada ou noutro solvente comprovadamente sem efeitos adversos no sistema de ensaio. Os semi-sólidos, cremes e ceras são normalmente ensaiados como se fossem líquidos. É necessário justificar convenientemente o recurso a outra diluição. Expõem-se as córneas aos líquidos e matérias tensioactivas durante 10 minutos. Se forem utilizados tempos de exposição diferentes, será necessário justificá-lo em termos científicos.

26. Os sólidos não-tensioactivos são normalmente ensaiados em solução ou suspensão, à concentração de 20 %, numa solução a 0,9 % de cloreto de sódio, em água destilada ou noutro solvente comprovadamente sem efeitos adversos no sistema de ensaio. Em determinadas circunstâncias e mediante justificação científica adequada, também pode ensaiar-se um sólido tal e qual, por aplicação directa na superfície da córnea pelo método da câmara aberta (ponto 29). Expõem-se as córneas aos sólidos durante quatro horas, mas, tal como no caso dos líquidos e dos produtos tensioactivos, podem utilizar-se tempos de exposição diferentes, que será necessário justificar em termos científicos.

27. Podem utilizar-se diversos métodos de tratamento, consoante a natureza física e as características químicas (sólidos, líquidos, líquidos viscosos ou não-viscosos, etc.) da substância em estudo. O aspecto crítico é garantir que a substância cobre adequadamente a superfície epitelial e é adequadamente removida na fase de lavagem. Utiliza-se normalmente um método de câmara fechada para o ensaio de líquidos não-viscosos ou ligeiramente viscosos e um método de câmara aberta para o ensaio de líquidos semi-viscosos ou viscosos, bem como para sólidos tal e qual.

28. No método da câmara fechada, introduz-se na câmara anterior, através dos orifícios de dosagem existentes na parte de cima desta, uma quantidade de substância em estudo suficiente para cobrir a superfície epitelial da córnea (750 µl), fechando em seguida os orifícios com as tampas respectivas durante a exposição. É importante que cada córnea seja exposta à substância em estudo durante o período adequado.

29. No método da câmara aberta, removem-se antes do tratamento a janela de vidro e o anel de fixação da janela da câmara anterior. Com uma micropipeta, aplica-se a substância em estudo ou de controlo directamente na superfície epitelial da córnea (750 µl ou um volume de substância em estudo suficiente para cobrir completamente a córnea). Se for difícil pipetar a substância em estudo, pode introduzir-se esta sob pressão numa pipeta volumétrica, para facilitar a dosagem. Para que a matéria em causa possa ser introduzida sob pressão na ponta da pipeta volumétrica, insere-se esta ponta na ponta da seringa. Pressiona-se o êmbolo da seringa e, simultaneamente, puxa-se o pistão da pipeta para cima. Se se formarem bolhas de ar na ponta da pipeta, remove-se (expulsa-se) a matéria em estudo e repete-se o processo, até a ponta da pipeta ficar cheia sem bolhas de ar. Se necessário, pode utilizar-se uma seringa normal (sem agulha), pois permite medir um volume exacto da substância em estudo e facilita a aplicação na superfície epitelial da córnea. Depois da dosagem, recoloca-se a janela de vidro na câmara anterior, para recriar um sistema fechado.

▼M2

Incubação após a exposição

30. Após o período de exposição, removem-se da câmara anterior a substância em estudo, a amostra de controlo negativa ou a substância de controlo positiva e lava-se o epitélio pelo menos três vezes (ou até deixar de se ver substância em estudo) utilizando EMEM com vermelho de fenol. Utiliza-se na lavagem meio de ensaio com vermelho de fenol porque pode seguir-se a evolução cromática do vermelho de fenol para determinar a eficácia de lavagem de matérias ácidas ou alcalinas. Lavam-se as córneas mais de três vezes se a cor do vermelho de fenol continuar alterada (amarelo ou púrpura) ou a substância em estudo ainda for visível. Quando o meio já não contiver a substância em estudo, lavam-se as córneas uma última vez utilizando EMEM sem vermelho de fenol, para garantir a remoção deste último da câmara anterior antes da medição de opacidade. Volta então a encher-se a câmara anterior com EMEM fresco sem vermelho de fenol.

31. No caso dos líquidos ou das matérias tensioactivas, após a lavagem, incubam-se as córneas durante mais duas horas a 32 ± 1 °C. Em determinadas circunstâncias, pode ser útil um tempo de incubação mais longo depois da exposição, a ponderar caso a caso. As córneas tratadas com sólidos são bem lavadas no final do período de exposição de quatro horas, mas não é necessária incubação suplementar.

32. Regista-se a opacidade e permeabilidade de cada córnea logo que terminar o período de incubação após a exposição, no caso dos líquidos e das matérias tensioactivas, ou o período de exposição de quatro horas, no caso dos sólidos não-tensioactivos. Examina-se ainda visualmente cada córnea e registam-se as observações pertinentes (descamação de tecidos, resíduos da substância em estudo, perfil de opacidade não-uniforme, etc.). Estas observações podem ser importantes, pois são passíveis de se traduzirem em variações nas leituras do opacímetro.

Substâncias de controlo

33. Incluem-se em cada ensaio amostras de controlo positivas e negativas (ou do solvente/veículo) correspondentes.

34. Ao ensaiar pelo método BCOP substâncias líquidas a 100 %, utiliza-se uma amostra de controlo negativa correspondente (por exemplo, solução a 0,9 % de cloreto de sódio ou água destilada), para possibilitar a detecção de alterações inespecíficas do sistema de ensaio e estabelecer uma linha de base para os parâmetros a determinar no ensaio. Essa amostra de controlo visa igualmente evitar que as condições do ensaio provoquem, inadequadamente, uma reacção de irritação.

35. Ao ensaiar líquidos, matérias tensioactivas ou sólidos diluídos, inclui-se no método BCOP um grupo correspondente de amostras de controlo do veículo/solvente, para possibilitar a detecção de alterações inespecíficas do sistema de ensaio e estabelecer uma linha de base para os parâmetros a determinar no ensaio. Só podem utilizar-se solventes/veículos que, comprovadamente, não tenham efeitos adversos no sistema de ensaio.

36. Para verificar se é induzida uma reacção apropriada, inclui-se em cada ensaio uma substância irritante ocular conhecida, para servir de amostra de controlo positiva correspondente. Como o ensaio BCOP é utilizado neste método de ensaio para identificar substâncias corrosivas ou fortemente irritantes, idealmente a amostra de controlo positiva deverá ser uma substância de referência que induza uma reacção forte ao aplicar-se-lhe o método. Porém, para que possa determinar-se a variabilidade no tempo da reacção à referida amostra de controlo positiva, a reacção de irritação não deve ser excessivamente forte.

37. Podem ser utilizadas como amostras de controlo positivas para substâncias em estudo líquidas, por exemplo, dimetilformamida ou solução a 1 % de hidróxido de sódio. Como amostra de controlo positiva para substâncias em estudo sólidas pode ser utilizada, por exemplo, solução a 0,9 % de cloreto de sódio.

▼M2

38. As substâncias de referência são úteis para avaliar o potencial de irritação ocular de produtos químicos desconhecidos de uma determinada classe química, ou classe de produtos, ou para avaliar o potencial de irritação relativo de uma substância irritante ocular numa determinada gama de reacções de irritação.

Parâmetros medidos

39. Determina-se a opacidade com base na quantidade de luz transmitida através da córnea. Determina-se quantitativamente a opacidade da córnea medindo-a com um opacímetro numa escala contínua de valores de opacidade.

40. Determina-se a permeabilidade com base na quantidade do corante fluoresceína sódica que penetra em todas as camadas celulares da córnea (ou seja, desde o epitélio da superfície exterior da córnea até ao endotélio da superfície interior da mesma). Coloca-se 1 ml de solução de fluoresceína sódica (4 ou 5 mg/ml, consoante se ensaiem líquidos ou matérias tensioactivas, por um lado, ou sólidos não-tensioactivos, por outro) na câmara anterior do suporte de córnea, que estabelece uma interface com a superfície epitelial da córnea. Enche-se com EMEM fresco a câmara posterior, que estabelece uma interface com a superfície endotelial da córnea. Incuba-se a seguir o suporte, em posição horizontal, durante 90±5 minutos, a 32±1 °C. Determina-se quantitativamente, por espectrofotometria UV/-VIS, a quantidade de fluoresceína sódica que atravessa a córnea para a câmara posterior. Os valores das medições espectrofotométricas a 490 nm são registados numa escala contínua de absorvância ou densidade óptica (DO_{490}). Determinam-se os valores de permeabilidade à fluoresceína utilizando os valores de DO_{490} obtidos com um espectrofotómetro de luz visível num percurso óptico normalizado de 1 cm.

41. Em alternativa, pode utilizar-se um dispositivo de leitura constituído por uma placa de microtitulação de 96 alvéolos, desde que: i) seja possível estabelecer uma gama de linearidade do leitor de placa para a determinação de valores de DO_{490} da fluoresceína; e ii) se utilize na placa de 96 alvéolos o volume de amostras de fluoresceína que permite obter correctamente valores de DO_{490} equivalentes aos obtidos com o percurso óptico normalizado de 1 cm (normalmente 360 ml, podendo ser necessário encher completamente os alvéolos).

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação dos dados

42. Depois de se corrigirem os valores de opacidade e de permeabilidade média (DO_{490}) em função dos valores da opacidade de fundo e da permeabilidade (DO_{490}) correspondente à amostra de controlo negativa, combinam-se numa fórmula empírica os valores médios de opacidade e de permeabilidade (DO_{490}) correspondentes a cada grupo de tratamento, a fim de calcular a respectiva pontuação de irritação *in vitro* (IVIS), do seguinte modo:

$$IVIS = \text{valor médio de opacidade} + 15 \times \text{valor médio de permeabilidade } (DO_{490})$$

Sina et al. (16) referiram que esta fórmula foi estabelecida com base em estudos no seu laboratório e interlaboratoriais. A fim de determinar a equação que melhor correlacionava os dados *in vivo* e *in vitro*, fez-se uma análise multivariada dos dados obtidos num estudo interlaboratorial de uma série de 36 compostos. Essa análise foi efectuada por cientistas de duas empresas distintas, que chegaram a duas equações praticamente idênticas.

43. Os valores de opacidade e de permeabilidade devem ser também avaliados independentemente uns dos outros, para determinar se a substância em estudo induz corrosividade ou irritação forte com base em apenas um dos dois parâmetros medidos.

▼M2

Critérios de decisão

44. Consideram-se corrosivas ou fortemente irritantes as substâncias que apresentem IVIS ≥ 55,1. Como referido no ponto 1, se não for possível atribuir a uma substância a classificação de substância corrosiva ou fortemente irritante ocular, será necessário efectuar mais ensaios para efeitos de classificação e rotulagem. O método BCOP tem as seguintes características: exactidão global de 79 % (113/143) a 81 % (119/147), taxa de falsos positivos de 19 % (20/103) a 21 % (22/103) e taxa de falsos negativos de 16 % (7/43) a 25 % (10/40), comparativamente aos dados obtidos pelo método de ensaio ocular *in vivo* no coelho, classificados de acordo com os sistemas de classificação EPA (1), UE (2) ou GHS (3). Excluindo da base de dados determinadas substâncias de certas classes químicas (álcoois, cetonas) ou físicas (sólidos), a exactidão do método BCOP nos sistemas de classificação EPA, UE e GHS situa-se entre 87 % (72/83) e 92 % (78/85), a taxa de falsos positivos entre 12 % (7/58) e 16 % (9/56) e a taxa de falsos negativos entre 0 % (0/27) e 12 % (3/26).

45. Mesmo que não seja possível atribuir à substância em estudo a classificação de corrosiva ou fortemente irritante ocular, os dados obtidos pelo método BCOP podem ser úteis, em conjugação com dados de ensaios oculares *in vivo* no coelho ou de ensaios *in vitro* adequadamente validados, para melhor avaliar a utilidade e limitações do método de ensaio BCOP na identificação de matérias não fortemente irritantes ou não-irritantes (está em curso a elaboração de um documento de orientações sobre a utilização de métodos de ensaio de toxicidade ocular *in vitro*).

Critérios de aceitação do estudo

46. Considera-se o ensaio aceitável se a IVIS correspondente à amostra de controlo positiva não se desviar da média histórica vigente mais que o dobro do desvio-padrão. Essa média deve ser actualizada pelo menos de três em três meses ou sempre que seja efectuado um ensaio aceitável num laboratório que não efectue estes ensaios com frequência (menos de uma vez por mês). Os valores de opacidade e permeabilidade correspondentes às amostras de controlo negativas ou do solvente/veículo devem ser inferiores aos limites superiores estabelecidos para os valores de opacidade e permeabilidade de fundo de córneas de bovino tratadas com a matéria de controlo negativa e o solvente/veículo respectivos.

Relatório do ensaio

47. O relatório do ensaio deve incluir as informações seguintes que sejam pertinentes na realização do estudo em causa:

Substâncias em estudo e de controlo

Denominação ou denominações químicas, como a denominação estrutural utilizada pelo Chemical Abstracts Service (CAS), seguida de outras denominações, se existirem;

Número de registo CAS, se for conhecido;

Grau de pureza e composição da substância ou mistura (em percentagem ponderal), se forem conhecidas;

Propriedades físico-químicas (por exemplo, estado físico, volatilidade, pH, estabilidade, classe química, hidrossolubilidade) relevantes para a realização do estudo;

Pré-tratamento das substâncias em estudo/de controlo, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

Estabilidade, se for conhecida.

▼M2

Informações relativas ao patrocinador e ao laboratório

Nome e endereço do patrocinador, do laboratório e do director do estudo;

Indicação da origem dos olhos (ou seja, da instalação na qual foram colhidos);

Condições de armazenagem e de transporte dos olhos (data-hora da colheita dos olhos, tempo decorrido até ao início dos ensaios, meios de transporte e condições de temperatura durante o transporte, antibióticos eventualmente utilizados, etc.);

Se forem conhecidas, especificidades dos animais nos quais os olhos foram colhidos (idade, sexo, peso, etc. do animal dador).

Justificação do método de ensaio e do protocolo utilizados

Integridade do método de ensaio

Processo utilizado para garantir a integridade (exactidão e fiabilidade) do método de ensaio ao longo do tempo (por exemplo, ensaio periódico das substâncias para a demonstração de competência, utilização de dados históricos das amostras de controlo positivas e negativas, etc.).

Critérios de aceitação de um ensaio

Amostras de controlo positivas e negativas correspondentes situadas num intervalo aceitável, com base nos dados históricos;

Se for aplicável, intervalos aceitáveis das amostras de referência de controlo correspondentes, com base nos dados históricos.

Condições de ensaio

Descrição do sistema de ensaio utilizado;

Tipo de suporte de córnea utilizado;

Informações sobre a calibração dos dispositivos utilizados para medir a opacidade e a permeabilidade (por exemplo, opacímetro e espectrofotómetro);

Informações sobre as córneas de bovino utilizadas, incluindo declarações sobre a qualidade das mesmas;

Pormenores sobre a execução do ensaio;

Concentração ou concentrações das substâncias em estudo utilizadas;

Descrição de eventuais modificações na execução do ensaio;

Referência a dados históricos do modelo (amostras de controlo positivas e negativas, substâncias para a demonstração de competência, substâncias de referência, etc.);

Descrição dos critérios de avaliação utilizados.

Resultados

Quadro dos resultados correspondentes a cada amostra em estudo (por exemplo, valores de opacidade e de DO_{490} e valor calculado da IVIS para a substância em estudo e para as amostras de controlo positivas, negativas e de referência (se for o caso), sob a forma de quadro, incluindo os dados correspondentes aos replicados efectuados, e médias ± desvio-padrão para cada ensaio);

Descrição de outros efeitos eventualmente observados.

Discussão dos resultados

Conclusões

REFERÊNCIAS

1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B--96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

▼M2

2) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Directivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006, JO L 353 de 31.12.2008, p. 1.

3) ONU (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Acessível em:

http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html

4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Acessível em:

http://ecvam.jrc.it/index.htm

5) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Acessível em:

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

6) Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de Dezembro de 2006, relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH), que cria a Agência Europeia dos Produtos Químicos, que altera a Directiva 1999/45/CE e revoga o Regulamento (CEE) n.º 793/93 do Conselho e o Regulamento (CE) n.º 1488/94 da Comissão, bem como a Directiva 76/769/CEE do Conselho e as Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE da Comissão, JO L 396 de 30.12.2006, p. 1.

7) OCDE (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Acessível em:

http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html

8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. Em: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Acessível em:

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

9) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Acessível em:

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm

10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Itália: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

▼**M2**

11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D., Sina, J. F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

12) Siegel, J. D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Acessível em:

http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf

13) Maurer, J. K., Parker, R. D., Jester, J. V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

14) Doughty, M. J., Petrou, S., Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

15) Collee, J., Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. *The Lancet* 349:636-641.

16) Sina, J. F., Galer, D. M., Sussman, R. S., Gautheron, P. D., Sargent, E. V., Leong, B., Shah, P. V., Curren, R. D., Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.

17) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Acessível em:

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm.

18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Acessível em:

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm

▼M2

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exactidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida da eficiência do método e um dos aspectos da «adequação». Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados correctos do método de ensaio.

Substância de referência: Substância utilizada como padrão de comparação com a substância em estudo. Deve ter as seguintes propriedades: i) origem ou origens uniformes e fiáveis; ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo; iii) características físico-químicas conhecidas; iv) disponibilidade de dados sobre os efeitos conhecidos; e v) potência conhecida situada na gama de reacção pretendida.

Córnea: Parte transparente anterior do globo ocular que recobre a íris e a pupila e deixa passar a luz para o interior.

Opacidade da córnea: Medição do grau de opacidade da córnea depois de exposta à substância em estudo. Um aumento de opacidade da córnea é indicador de lesão da córnea. A opacidade pode ser avaliada subjectivamente, como é feito no ensaio ocular no coelho pelo método de Draize, ou objectivamente, utilizando um instrumento como um «opacímetro».

Permeabilidade da córnea: Medição quantitativa da lesão epitelial da córnea por determinação da quantidade do corante fluoresceína sódica que atravessa todas as camadas celulares da córnea.

Categoria 1 EPA: Acção corrosiva (destruição irreversível do tecido ocular) ou afecção ou irritação da córnea que se mantêm durante mais de 21 dias (1).

Categoria R41 UE: Lesão do tecido ocular ou degradação grave da visão em consequência da aplicação da substância em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação (2).

Taxa de falsos negativos: Proporção das substâncias positivas que o método de ensaio considera erradamente negativas. É um dos indicadores de eficiência dos métodos de ensaio.

Taxa de falsos positivos: Proporção das substâncias negativas que o método de ensaio considera erradamente positivas. É um dos indicadores de eficiência dos métodos de ensaio.

GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos): Sistema (designado em inglês por *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa com vista à protecção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência, etc.) e do ambiente (3).

▼M2

Categoria 1 GHS: Lesão do tecido ocular ou degradação grave da visão na consequência da aplicação da substância em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação (3).

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, susceptível de causar efeitos adversos num organismo, sistema ou (sub)população que lhe seja exposta.

Pontuação de irritação *in vitro* (IVIS): Fórmula empírica utilizada no ensaio BCOP que combina os valores médios de opacidade e de permeabilidade referentes a um grupo de tratamento numa pontuação *in vitro* única para esse grupo. *IVIS* = valor médio de opacidade + (15 x valor médio de permeabilidade).

Amostra de controlo negativa: Replicado não-tratado que contém todos os componentes do sistema de ensaio. Esta amostra é ensaiada juntamente com as amostras tratadas com a substância em estudo e as outras amostras de controlo, para determinar se o solvente interage com o sistema de ensaio.

Substância não-irritante: Substância não classificada nas categorias I, II ou III EPA nem nas categorias R41 ou R36 UE nem nas categorias 1, 2A ou 2B GHS de irritantes oculares.

Substância corrosiva ocular: a) Substância que provoca lesões irreversíveis dos tecidos do olho; b) Substância classificada na categoria 1 GHS, na categoria I EPA ou na categoria R41 UE de irritantes oculares (1) (2) (3).

Substância irritante ocular: a) Substância que, aplicada na superfície anterior do olho, provoca alterações reversíveis no mesmo. b) Substância classificada nas categorias II ou III EPA, na categoria R36 UE ou nas categorias 2A ou 2B GHS de irritantes oculares (1) (2) (3).

Substância fortemente irritante ocular: a) Substância que, aplicada na superfície anterior do olho, provoca lesões dos tecidos do olho que não desaparecem nos 21 dias após a aplicação ou que provoca uma degradação grave da visão; b) Substância classificada na categoria 1 GHS, na categoria I EPA ou na categoria R41 UE de irritantes oculares (1) (2) (3).

Opacímetro: Instrumento utilizado para medir a «opacidade da córnea» por determinação quantitativa da luz transmitida através da córnea. Normalmente, o instrumento tem dois compartimentos, dispondo cada um deles de uma fonte luminosa e de uma célula fotoeléctrica. Um compartimento é utilizado para a córnea tratada e o outro para calibrar o instrumento e para regular o zero deste. Envia-se luz de uma lâmpada de halogénio, através de um compartimento de controlo (câmara vazia, sem janelas nem líquido), para uma célula fotoeléctrica e compara-se com a luz igualmente enviada para uma célula fotoeléctrica através do compartimento experimental, que compreende a câmara na qual se colocou a córnea. O dispositivo compara a luz transmitida para as células fotoeléctricas, determina a diferença e exibe o valor numérico da opacidade num visor digital.

Amostra de controlo positiva: Replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com uma substância que, comprovadamente, induz reacção positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade no tempo da reacção a esta amostra de controlo, essa reacção não deve ser excessivamente forte.

▼M2

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial, bem como da repetibilidade intralaboratorial.

Amostra de controlo do solvente/veículo: Amostra não-tratada que contém todos os componentes do sistema de ensaio, incluindo o solvente ou veículo, e é ensaiada, juntamente com as amostras tratadas com a substância em estudo e as outras amostras de controlo, para estabelecer a linha de base de reacção para as amostras tratadas com a substância em estudo, dissolvida no mesmo solvente ou veículo. Quando ensaiada com uma amostra de controlo negativa correspondente, esta amostra também permite determinar se o solvente ou veículo interage com o sistema de ensaio.

Ensaio por etapas: Estratégia sequencial de ensaio em que, seguindo uma ordem estabelecida, se avalia toda a informação disponível sobre a substância em estudo, por um processo baseado na ponderação da suficiência de prova em cada etapa, com o objectivo de determinar se existe informação suficiente para uma decisão de classificação de perigosidade antes de passar à etapa seguinte. Se a informação existente possibilitar a atribuição de um potencial de irritação à substância em estudo, não serão necessários mais ensaios. Se a informação existente não possibilitar a atribuição de um potencial de irritação à substância em estudo, proceder-se-á a uma série de ensaios sequenciais em animais até ser possível atribuir uma classificação inequívoca.

Método de ensaio validado: Método de ensaio relativamente ao qual foram concluídos estudos de validação com vista a determinar a adequação (incluída a exactidão) e fiabilidade para uma finalidade específica. É importante referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exacto e fiável para ser considerado aceitável para a finalidade pretendida.

Ponderação da suficiência da prova: Processo que consiste em ponderar os pontos fortes e os pontos fracos dos vários elementos de informação com vista a chegar-se a uma conclusão fundamentada sobre o potencial de perigosidade da substância.

▼M2

Apêndice 2

Substâncias recomendadas para a demonstração de competência técnica no método de ensaio de opacidade e permeabilidade da córnea em bovinos (BCOP)

Antes de um método de ensaio conforme ao presente método passar a ser utilizado por rotina, os laboratórios podem pretender comprovar a sua competência técnica identificando correctamente a classificação de corrosividade ocular das dez substâncias recomendadas no quadro 1. Estas substâncias foram seleccionadas de modo a representarem a gama de reacções de irritação/corrosão ocular local obtida no ensaio ocular *in vivo* no coelho (TG 405) (ou seja, as categorias 1, 2A, 2B ou não classificado nem rotulado do sistema GHS da ONU (3) (7)). Porém, atendendo à utilização destes ensaios que se encontra validada (unicamente a identificação de substâncias corrosivas/fortemente irritantes oculares), apenas há que demonstrar competência em relação a dois resultados classificativos obtidos no ensaio (corrosivo/fortemente irritante ou não-corrosivo/não fortemente irritante). Outros critérios de selecção foram a disponibilidade da substância no comércio, a existência de dados de referência *in vivo* de alta qualidade e a existência de dados de alta qualidade relativos aos dois métodos *in vitro* para os quais estão a ser elaboradas directrizes de ensaio (*test guidelines*). Foi nesta base que se seleccionaram substâncias irritantes da lista recomendada pelo ICCVAM de 122 substâncias de referência para a validação de métodos de ensaio de toxicidade ocular *in vitro* (ver o apêndice H: *ICCVAM Recommended Reference Substances*) (5). Os *Background Review Documents* do ICCVAM (17) (18) contêm dados de referência relativos aos métodos BCOP e ICE (método de ensaio em olhos de frango isolados).

Quadro 1

Substâncias recomendadas para a demonstração de competência técnica no método BCOP

Substância química	N.º CAS (CASRN)	Classe química (1)	Fase	Classificação *in vivo* (2)	Classificação *in vitro* (3)
Cloreto de benzalcónio (5 %)	8001-54-5	Sal de amónio quaternário	Líquida	Categoria 1	Corrosivo/Fortemente irritante
Clorexidina	55-56-1	Amina, Amidina	Sólida	Categoria 1	Corrosivo/Fortemente irritante
Ácido dibenzoil-l--tartárico	2743-38-6	Ácido carboxílico, Éster	Sólida	Categoria 1	Corrosivo/Fortemente irritante
Imidazole	288-32-4	Composto heterocíclico	Sólida	Categoria 1	Corrosivo/Fortemente irritante
Ácido tricloroacético (30 %)	76-03-9	Ácido carboxílico	Líquida	Categoria 1	Corrosivo/Fortemente irritante
Cloreto de 2,6-diclorobenzoílo	4659-45-4	Halogeneto de acilo	Líquida	Categoria 2A	Não-corrosivo/Não fortemente irritante
2-Metilacetoacetato de etilo	609-14-3	Cetona, Éster	Líquida	Categoria 2B	Não-corrosivo/Não fortemente irritante
Nitrato de amónio	6484-52-2	Sal inorgânico	Sólida	Categoria 2A	Não-corrosivo/Não fortemente irritante

▼**M2**

Substância química	N.º CAS (CASRN)	Classe química (1)	Fase	Classificação *in vivo* (2)	Classificação *in vitro* (3)
Glicerol	56-81-5	Álcool	Líquida	Não atribuída	Não-corrosivo/Não fortemente irritante
n-Hexano	110-54-3	Hidrocarboneto (acíclico)	Líquida	Não atribuída	Não-corrosivo/Não fortemente irritante

Abreviaturas: CASRN = Número de registo do Chemical Abstracts Service.

(1) As substâncias foram classificadas em classes químicas segundo um sistema normalizado, com base nos Medical Subject Headings («classificadores de temas médicos», MeSH) da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos da América (http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Com base nos resultados do ensaio ocular *in vivo* no coelho (TG 405 da OCDE) e no sistema GHS da ONU (3) (7).

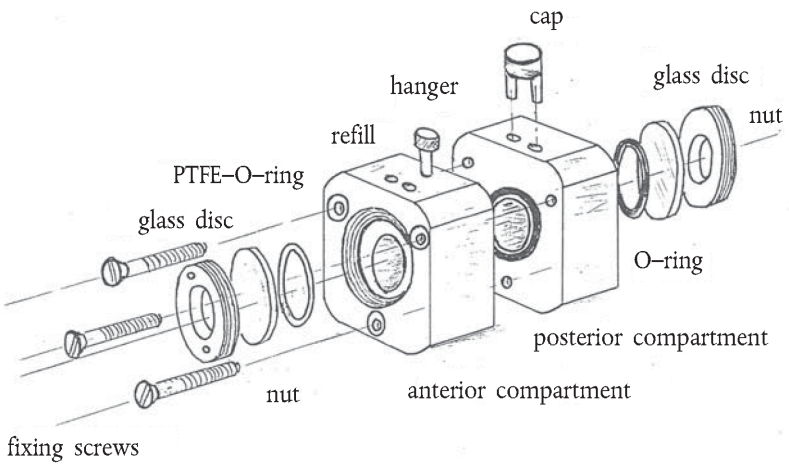
(3) Com base nos resultados obtidos pelos métodos BCOP e ICE.

▼M2

Apêndice 3

SUPORTE DE CÓRNEA PARA O ENSAIO BCOP

1. Os suportes de córnea utilizados no método BCOP são feitos de um material inerte (por exemplo, polipropileno) e constituídos por duas metades (uma anterior e outra posterior), possuindo duas câmaras cilíndricas internas semelhantes. Cada câmara tem o volume de 5 ml e termina numa janela de vidro, através da qual são efectuadas as medições de opacidade. As dimensões interiores de cada câmara são 1,7 cm de diâmetro e 2,2 cm de profundidade ([1]). Para evitar fugas, aplica-se uma anilha na câmara posterior. Coloca-se a córnea sobre a anilha da câmara posterior, com a parte endotelial voltada para esse lado, e aplica-se a câmara anterior sobre a parte epitelial da córnea. As câmaras são fixadas com três parafusos periféricos de aço inoxidável. Na extremidade de cada câmara existe uma janela de vidro, que pode ser retirada para facilitar o acesso à córnea. Novamente para evitar fugas, coloca-se uma anilha entre cada câmara e a janela de vidro. Para se poder introduzir e remover o meio de ensaio e os compostos em estudo, existem dois orifícios na parte superior de cada câmara, que são fechados com tampas de borracha durante os períodos de tratamento e incubação.



Legenda

Glass disc: disco de vidro;

PTFE-O-ring: anilha de PTFE;

Refill: câmara para reenchimento;

Hanger: suspensor;

Cap: tampa;

Nut: porca;

O-ring: anilha;

Posterior compartment: câmara posterior;

Anterior compartment: câmara anterior;

Fixing screws: parafusos de fixação.

([1]) Estas dimensões referem-se a suportes de córnea utilizados para vacas com idade compreendida entre 12 e 60 meses. Se se tratar de animais com idade compreendida entre 6 e 12 meses, cada câmara terá de ter um volume de 4 ml e de medir internamente 1,5 cm de diâmetro e 2,2 cm de profundidade. É muito importante que, em qualquer suporte de córnea que venha a ser desenhado, a razão entre a superfície de córnea exposta e o volume da câmara posterior seja idêntica à que se verifica nos suportes de córnea convencionais. Isto é necessário para garantir que os valores de permeabilidade são determinados correctamente para o cálculo do IVIS pela fórmula proposta.

▼**M2**

OPACÍMETRO

2. Trata-se de um dispositivo que mede a transmissão de luz. Envia-se luz de uma lâmpada de halogénio, através de um compartimento de controlo (câmara vazia, sem janelas nem líquido), para uma célula fotoeléctrica e compara-se com a luz igualmente enviada para uma célula fotoeléctrica através do compartimento experimental, que compreende a câmara na qual se colocou a córnea. O dispositivo compara a luz transmitida para as células fotoeléctricas, determina a diferença e exibe o valor numérico da opacidade num visor digital. Estabelecem-se as unidades de opacidade.

3. O opacímetro deve responder linearmente num intervalo de valores de opacidade que cubra os limites utilizados para todas as classificações descritas no modelo de previsão (ou seja, até ao limite de corrosão/forte irritação). Para obter uma escala de leitura linear e exacta até 75-80 unidades de opacidade, é necessário calibrar o opacímetro com uma série de calibradores. Para isso, colocam-se calibradores (placas opacas de poliéster) na câmara de calibração (câmara de suporte de córnea desenhada para a inserção de calibradores) e efectuam-se as leituras correspondentes com o opacímetro. A câmara de calibração é desenhada para que os calibradores nela sejam inseridos a uma distância entre a fonte de luz e a célula fotoeléctrica aproximadamente igual à utilizada nas medições de opacidade com córneas. Começa por se calibrar o zero do opacímetro utilizando a câmara de calibração sem nenhum calibrador. Em seguida, colocam-se sucessivamente nessa câmara três calibradores diferentes, medindo-se as opacidades respectivas. As leituras de opacidade correspondentes aos calibradores 1, 2 e 3 devem ser iguais aos valores estabelecidos respectivos de 75, 150 e 225 unidades de opacidade, com um desvio de ± 5 %.

▼M2

B.48 MÉTODO DE ENSAIO EM OLHOS DE FRANGO ISOLADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUE PRODUZAM CORROSÃO OU FORTE IRRITAÇÃO OCULAR

INTRODUÇÃO

1. O método de ensaio em olhos de frango isolados é um método *in vitro* que, em determinadas circunstâncias e dentro de certos limites, pode ser utilizado para atribuir a substâncias e misturas a classificação de «substância corrosiva ou fortemente irritante ocular» (1) (2) (3). Para efeitos do presente método, considera-se «substância fortemente irritante» uma substância irritante que induz no coelho lesões oculares que permanecem durante pelo menos 21 dias após a aplicação. Embora não esteja validado para substituir completamente o ensaio ocular *in vivo* no coelho, recomenda-se a integração do método ICE numa estratégia de ensaio por etapas para a classificação e rotulagem regulamentares, dentro do domínio de aplicabilidade especificado (4) (5). Sem necessidade de ensaios complementares, pode atribuir-se a uma substância ou mistura em estudo (6) que dê resultado positivo neste método a classificação de substância corrosiva ou fortemente irritante ocular. Uma substância que dê resultado negativo terá de ser ensaiada no coelho pela estratégia de ensaio sequencial descrita no *Test Guideline 405* da OCDE (7) (capítulo B.5 do presente anexo).

2. Pretende-se na descrição deste método de ensaio explicar o processo utilizado para avaliar o potencial de corrosão ou forte irritação ocular de uma substância, medido pela sua capacidade de indução tóxica em olhos de frango desorbitados. Medem-se os efeitos tóxicos na córnea do seguinte modo: i) avaliação qualitativa da opacidade; ii) avaliação qualitativa das lesões epiteliais após aplicação de fluoresceína ao olho (retenção da fluoresceína); iii) determinação quantitativa do espessamento (edema); iv) avaliação qualitativa das lesões morfológicas macroscópicas na superfície. Após exposição à substância em estudo, avaliam-se separadamente a opacidade, o edema e as lesões da córnea; em seguida, combinam-se os resultados a fim de obter a classificação de irritação ocular.

3. Também foram ensaiados pelo método ICE substâncias irritantes oculares indutoras de lesões que desaparecem em menos de 21 dias, assim como substâncias não-irritantes. A exactidão e a fiabilidade do método ICE não foram, porém, formalmente avaliadas na aplicação do método a substâncias destas categorias.

4. Estabelecem-se definições no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

5. Este método de ensaio baseia-se no protocolo do método ICE do ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (8), que foi elaborado no seguimento de um estudo de validação internacional (4) (5) (9) e contou com contributos do ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods), do JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) e do Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology do TNO (Países Baixos). O protocolo baseia-se na informação obtida nos protocolos publicados e no protocolo que está a ser utilizado pelo TNO (10) (11) (12) (13) (14).

▼M2

6. As limitações identificadas deste método decorrem da taxa de falsos positivos no caso dos álcoois e das taxas de falsos negativos no caso dos sólidos e das matérias tensioactivas (ver o ponto 47) (4). Excluindo da base de dados as substâncias dessas classes físico-químicas, aumenta substancialmente a exactidão do método ICE nos sistemas de classificação UE, EPA e GHS. Atendendo aos objectivos do ensaio (apenas a identificação de substâncias corrosivas/fortemente irritantes oculares), as taxas de falsos negativos não são um aspecto crítico, pois as substâncias seriam a seguir ensaiadas no coelho ou por outros métodos *in vitro* adequadamente validados, conforme as disposições regulamentares, por recurso a uma estratégia de ensaio sequencial baseada na ponderação da suficiência da prova. Acresce que a base de dados de validação actualmente disponível não permite uma avaliação adequada de algumas classes químicas ou classes de produtos (por exemplo, misturas). Os investigadores podem, no entanto, ponderar o recurso a este método para ensaiar todos os tipos de matérias (incluindo misturas), aceitando um resultado positivo como um indício de reacção corrosiva ou fortemente irritante ocular. Porém, os resultados positivos obtidos no caso de álcoois devem ser interpretados com cautela, devido ao risco de não serem efectivamente positivos em todos os casos que o indiciem.

7. Na manipulação de olhos de frango devem seguir-se as regras e procedimentos estabelecidos no laboratório para a manipulação de matérias de origem humana ou animal (tecidos, fluidos biológicos, etc.). Recomenda-se a aplicação das precauções gerais inerentes à prática laboratorial (15).

8. Uma limitação deste método de ensaio é o facto de que, embora tenha em conta alguns efeitos oculares avaliados pelo método de ensaio da irritação ocular no coelho e, em certa medida, a gravidade desses efeitos, não tem em conta as lesões na conjuntiva ou na íris. Por outro lado, embora a reversibilidade das lesões da córnea não possa ser avaliada *per se* no método ICE, foi proposta, com base em estudos oculares no coelho, a possibilidade de se recorrer à avaliação da profundidade inicial da lesão da córnea para estabelecer uma distinção entre efeitos reversíveis e efeitos irreversíveis (16). Finalmente, o método ICE não permite avaliar o potencial de toxicidade sistémica associado à exposição ocular.

9. Prosseguem os trabalhos com vista à melhor caracterização da utilidade e das limitações do método de ensaio ICE na identificação de matérias não fortemente irritantes ou não-irritantes (ver também o ponto 48). Incentiva-se os utilizadores do método a fornecerem espécimes e/ou dados a organizações de validação, para que seja avaliada formalmente a possibilidade de outras utilizações futuras do método ICE, designadamente na identificação de matérias não fortemente irritantes oculares e de matérias não-irritantes.

10. Os laboratórios que comecem a utilizar este ensaio devem recorrer às substâncias químicas para demonstração de competência técnica recomendadas no apêndice 2. Antes de apresentarem dados obtidos pelo método ICE para efeitos da classificação regulamentar de perigosidade, os laboratórios podem recorrer às referidas substâncias para demonstrar a sua competência técnica na execução deste método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

11. O método ICE assenta num modelo organotípico de manutenção de olhos de frango *in vitro* por um período curto. Neste método de ensaio, as lesões provocadas pela substância em estudo são avaliadas por determinação do edema e da opacidade da córnea e da retenção de fluoresceína na córnea. A avaliação dos dois últimos parâmetros é qualitativa, enquanto a análise do edema da córnea é quantitativa. Converte-se cada medida numa pontuação quantitativa, utilizada para calcular um índice global de irritação, ou é atribuída a cada medida uma categoria qualitativa, utilizada para estabelecer uma classificação de corrosão e forte irritação ocular *in vitro*. Com base num ou noutro desses resultados, pode em seguida prever-se o potencial de corrosão ou forte irritação ocular *in vivo* da substância em estudo (ver Critérios de decisão).

▼M2

Origem e idade dos olhos de frango

12. Os olhos utilizados neste ensaio são normalmente colhidos em matadouros, de frangos abatidos para consumo humano, eliminando assim a necessidade de animais de laboratório. Só podem ser utilizados olhos de animais saudáveis considerados adequados para entrarem na cadeia alimentar humana.

13. Embora não tenha sido efectuado um estudo destinado a avaliar a idade óptima dos frangos, as aves utilizadas neste método de ensaio têm habitualmente a idade e o peso dos frangos normalmente abatidos nos matadouros de aves de capoeira (aproximadamente 7 semanas e 1,5 a 2,5 kg).

Colheita e transporte dos olhos para o laboratório

14. Imediatamente após o atordoamento dos frangos, normalmente por descarga eléctrica, e incisão no pescoço para sangramento, corta-se-lhes a cabeça. A origem dos frangos deve ser próxima do laboratório, para que as cabeças possam ser para aí transferidas do matadouro com suficiente rapidez, a fim de minimizar a deterioração e/ou as contaminações bacteriológicas. O intervalo entre a colheita das cabeças de frango e a utilização dos olhos no método ICE deve ser mínimo (normalmente duas horas) e não deve, comprovadamente, comprometer os resultados do ensaio. Os resultados dos ensaios estão relacionados com os critérios de selecção dos olhos e com as reacções às amostras de controlo positivas e negativas. Os olhos utilizados num ensaio devem ser todos do mesmo grupo de colheita num determinado dia.

15. Os olhos são dissecados no laboratório, pelo que se transportam as cabeças intactas do matadouro em caixas de plástico, à temperatura ambiente, humedecidas com toalhas embebidas em solução salina isotónica.

Critérios de selecção dos olhos utilizados no método ICE

16. Rejeitam-se os olhos que, depois de desorbitados, apresentem uma linha de base elevada de reacção cromática à fluoresceína (> 0,5) ou de pontuação de opacidade da córnea (> 0,5).

17. Cada grupo de tratamento e a amostra de controlo positiva correspondente é constituído por um mínimo de três olhos. O grupo de controlo negativo ou a amostra de controlo do solvente (caso se utilize um solvente que não seja a solução salina) é constituído por, pelo menos, um olho.

PROCEDIMENTO

Preparação dos olhos

18. Excisam-se cautelosamente as pálpebras, tomando as precauções necessárias para não danificar a córnea. Para avaliar a integridade desta, deita-se na sua superfície uma gota de solução a 2 % (m/v) de fluoresceína sódica, espera-se alguns segundos e lava-se com solução salina isotónica. Para garantir que a córnea está isenta de lesões (retenção de fluoresceína e pontuação de opacidade da córnea ≤ 0,5), examinam-se a seguir os olhos tratados com fluoresceína por meio de um microscópio equipado com uma lâmpada de fenda.

19. Se o olho não apresentar lesões, disseca-se completamente do crânio, tomando as precauções necessárias para não danificar a córnea. Para retirar o globo ocular da órbita, prende-se firmemente a membrana nictante com uma pinça cirúrgica e cortam-se os músculos oculares com uma tesoura encurvada de pontas rombas. É importante evitar lesões da córnea provocadas por pressão excessiva (ditas artefactos de compressão).

20. Ao remover o olho da órbita, deve deixar-se agarrada àquele uma porção visível do nervo óptico. Uma vez desorbitado, coloca-se o olho numa compressa absorvente e cortam-se a membrana nictante e os restantes tecidos de ligação.

▼M2

21. Coloca-se o olho desorbitado num suporte de aço inoxidável, com a córnea na vertical, e transfere-se o conjunto para uma das câmaras do aparelho de superfusão (16). Colocam-se os suportes no aparelho de superfusão de tal modo que a solução salina isotónica goteje sobre toda a córnea. As câmaras do aparelho de superfusão devem ser termostatizadas a 32 ± 1,5 °C. Apresenta-se no apêndice 3 um diagrama de um aparelho de superfusão típico e dos suportes oculares, que podem ser adquiridos no comércio ou construídos. O aparelho pode ser modificado para corresponder às necessidades do laboratório (por exemplo, para nele ser introduzido outro número de olhos).

22. Após serem colocados no aparelho de superfusão, examinam-se novamente os olhos ao microscópio com lâmpada de fenda, para garantir que não foram danificados durante a dissecação. Mede-se também nessa ocasião a espessura da córnea no seu ápice, utilizando o dispositivo de medição de profundidade incorporado no microscópio. Devem substituir-se os olhos que apresentem i) pontuação de retenção de fluoresceína > 0,5, ii) opacidade da córnea > 0,5 ou iii) qualquer outro sinal de dano. Rejeitam-se ainda os olhos que, não tendo sido rejeitados com base em nenhum destes critérios, apresentem uma espessura de córnea que se desvie mais de 10 % do valor médio correspondente a todos os olhos. Alertam-se os utilizadores para o facto de os microscópios com lâmpada de fenda poderem dar resultados diferentes para as medições de espessura da córnea se a regulação da fenda for outra. A largura da fenda deve ser regulada a 0,095 mm.

23. Os olhos examinados e aprovados são incubados durante 45 a 60 minutos, para estabelecer o equilíbrio com o sistema de ensaio antes das determinações. Depois de terminado o período previsto para se atingir o equilíbrio, regista-se como linha de base (tempo = 0) uma determinação de referência «zero» de opacidade e de espessura da córnea. A pontuação de retenção de fluoresceína determinada na dissecação é utilizada para linha de base desse parâmetro.

Aplicação da substância em estudo

24. Imediatamente após as determinações de referência «zero», remove-se o olho (mantendo-o no suporte) do aparelho de superfusão e coloca-se na horizontal, aplicando-se na córnea a substância em estudo.

25. As substâncias líquidas são normalmente ensaiadas sem diluição, mas, se for considerado necessário (devido ao modo como o estudo foi concebido, por exemplo), podem ser diluídas. O solvente preferido para diluir as substâncias é soro fisiológico. Embora possam utilizar-se outros solventes, em condições controladas, será necessário demonstrar que são adequados.

26. As substâncias em estudo líquidas aplicam-se na córnea de modo a cobri-la uniformemente. O volume normal é 0,03 ml.

27. Se possível, as substâncias sólidas devem ser moídas o máximo possível com um pilão num almofariz, ou com um dispositivo de moagem comparável. O pó é depois aplicado na córnea de modo a cobrir uniformemente a superfície desta com a substância em estudo. A quantidade normal é 0,03 g.

28. Mantém-se a substância em estudo (líquida ou sólida) aplicada na córnea durante 10 segundos e, em seguida, lava-se o olho, para a remover, com solução salina isotónica à temperatura ambiente (cerca de 20 ml). Recoloca-se em seguida o olho (no seu suporte) no aparelho de superfusão, na posição vertical original.

Substâncias de controlo

29. Incluem-se em cada ensaio amostras de controlo positivas e negativas (ou do solvente/veículo) correspondentes.

▼M2

30. Ao ensaiar pelo método ICE substâncias líquidas a 100 % ou sólidos, utiliza-se soro fisiológico como amostra de controlo negativa correspondente, para possibilitar a detecção de alterações inespecíficas do sistema de ensaio e evitar que as condições do ensaio provoquem, inadequadamente, uma reacção de irritação.

31. Ao ensaiar líquidos diluídos, inclui-se no método de ensaio um grupo correspondente de amostras de controlo do veículo/solvente, para possibilitar a detecção de alterações inespecíficas do sistema de ensaio e evitar que as condições do ensaio provoquem, inadequadamente, uma reacção de irritação. Como se referiu no ponto 25, só podem utilizar-se solventes/-veículos que, comprovadamente, não tenham efeitos adversos no sistema de ensaio.

32. Para verificar se é induzida uma reacção apropriada, inclui-se em cada ensaio uma substância irritante ocular conhecida, para servir de amostra de controlo positiva correspondente. Como o ensaio ICE é utilizado neste método de ensaio para identificar substâncias corrosivas ou fortemente irritantes, a amostra de controlo positiva deverá ser uma substância de referência que induza uma reacção forte ao aplicar-se-lhe o método. Porém, para que possa determinar-se a variabilidade no tempo da reacção à referida amostra de controlo positiva, essa reacção não deve ser excessivamente forte. Os dados *in vitro* obtidos no caso das amostras de controlo positivas devem ser suficientes para calcular um intervalo aceitável, estatisticamente definido, respeitante à amostra de controlo positiva. Caso não se disponha de dados históricos adequados do método ICE para uma determinada amostra de controlo positiva, pode ser necessário efectuar estudos para obter tais informações.

33. Podem ser utilizados como amostras de controlo positivas para substâncias em estudo líquidas, por exemplo, ácido acético a 10 % ou cloreto de benzalcónio a 5 %. Como amostras de controlo positivas para substâncias em estudo sólidas podem ser utilizados, por exemplo, o hidróxido de sódio ou o imidazole.

34. As substâncias de referência são úteis para avaliar o potencial de irritação ocular de produtos químicos desconhecidos de uma determinada classe química, ou classe de produtos, ou para avaliar o potencial de irritação relativo de uma substância irritante ocular numa determinada gama de reacções de irritação.

Parâmetros medidos

35. Avaliam-se as córneas tratadas antes do tratamento e decorridos 30, 75, 120, 180 e 240 minutos (± 5 minutos) após a lavagem subsequente ao tratamento. Obtém-se, assim, um número adequado de determinações no período de quatro horas que se segue ao tratamento, garantindo ainda um intervalo entre determinações suficiente para a realização das observações necessárias em todos os olhos.

36. Os parâmetros avaliados são a opacidade e o edema da córnea, a retenção de fluoresceína na córnea e efeitos morfológicos na córnea (picado epitelial ou perda de epitélio, por exemplo). Com excepção da retenção de fluoresceína (que só é determinada antes do tratamento e 30 minutos após a exposição à substância em estudo), todos estes parâmetros são determinados nos tempos acima referidos.

37. Recomenda-se o recurso a fotografias para documentar a opacidade da córnea, a retenção de fluoresceína na córnea, os efeitos morfológicos e, se for efectuada, a histopatologia.

38. Recomenda-se aos utilizadores que, depois do último exame, iniciado 4 horas após o tratamento, conservem os olhos num fixador adequado (por exemplo, formol tamponado neutro), para eventual exame histopatológico.

▼M2

39. Determina-se o edema da córnea medindo a espessura da córnea com o paquímetro óptico do microscópio com lâmpada de fenda. O resultado é expresso em percentagem e é calculado a partir das determinações de espessura da córnea, por meio da seguinte fórmula:

$$\left[\frac{\textit{espessura da córnea em } t \; - \; \textit{espessura da córnea em } = 0}{\textit{espessura da córnea em } = 0}\right] \times 100$$

40. Calcula-se a média percentual dos edemas da córnea de todos os olhos ensaiados em cada instante «t» considerado. Com base na pontuação média mais elevada de edema da córnea, observada em qualquer dos instantes considerados, atribui-se, em seguida, a pontuação global desta categoria a cada substância em estudo.

41. Calcula-se a opacidade da córnea atribuindo uma pontuação à superfície que se encontre mais densamente opacificada em cada córnea. Calcula-se o valor médio de opacidade da córnea de todos os olhos ensaiados em cada instante considerado. Com base na pontuação média mais elevada de opacidade da córnea, observada em qualquer dos instantes considerados, atribui-se em seguida a pontuação global desta categoria a cada substância em estudo (quadro 1).

Quadro 1

Pontuações de opacidade da córnea

Pontuação	Observações
0	Ausência de opacidade
0,5	Opacidade muito ligeira
1	Zonas dispersas ou difusas; detalhes da íris claramente visíveis
2	Zona translúcida claramente discernível; detalhes da íris ligeiramente obscurecidos
3	Forte opacidade da córnea; nenhum detalhe da íris visível; tamanho da pupila dificilmente discernível
4	Opacidade completa da córnea; íris invisível

42. O valor médio da retenção de fluoresceína de todos os olhos ensaiados só é calculado para a observação efectuada aos 30 minutos, tempo utilizado para a atribuição de uma pontuação global desta categoria a cada substância em estudo (quadro 2).

Quadro 2

Pontuações de retenção da fluoresceína

Pontuação	Observações
0	Ausência de retenção de fluoresceína
0,5	Número muito reduzido de células isoladas coradas
1	Células isoladas coradas dispersas pela zona tratada da córnea
2	Focos ou confluência densa de células isoladas coradas
3	Retenção de fluoresceína em zonas extensas confluentes da córnea

▼M2

43. Incluem-se nos efeitos morfológicos o «picado» das células epiteliais da córnea, a «perda» de epitélio, a «aspereza» da superfície da córnea e a «colagem» da substância em estudo à córnea. Estes efeitos podem ser concomitantes e de intensidade variável. A sua classificação é subjectiva e depende da interpretação do investigador.

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação dos dados

44. Avaliam-se separadamente os resultados de opacidade da córnea, edema da córnea e retenção de fluoresceína na córnea para determinar a classe correspondente a cada um destes parâmetros pelo método ICE. Combinam-se depois essas classes de modo a obter a classificação de irritação correspondente à substância em estudo.

Critérios de decisão

45. Uma vez efectuada a avaliação de cada parâmetro, podem atribuir-se as classes ICE com base em intervalos preestabelecidos. Estabelece-se a correspondência entre os valores de espessura da córnea (quadro 3), opacidade da córnea (quadro 4) e retenção de fluoresceína na córnea (quadro 5) e quatro classes ICE, de acordo com as seguintes escalas:

Quadro 3

Critérios de classificação ICE de espessura da córnea

Valor médio de edema da córnea (%) (*)	Classe ICE
0 a 5	I
> 5-12	II
> 12-18 (> 75 minutos após tratamento)	II
> 12-18 (≤ 75 minutos após tratamento)	III
> 18-26	III
> 26-32 (> 75 minutos após tratamento)	III
> 26-32 (≤ 75 minutos após tratamento)	IV
> 32	IV

(*) Esta pontuação de edema da córnea só é aplicável se a espessura for medida por meio de um microscópio com lâmpada de fenda Haag-Streit BP900 dotado do dispositivo n.º I de medição de profundidade e com a largura da fenda regulada a 9½, correspondente a 0,095 mm. Alertam-se os utilizadores para o facto de os microscópios com lâmpada de fenda poderem dar resultados diferentes para as medições de espessura da córnea se a regulação da fenda for outra.

Quadro 4

Critérios de classificação ICE de opacidade

Valor médio da pontuação máxima de opacidade (*)	Classe ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Ver o quadro 1.

▼**M2**

Quadro 5

Critérios de classificação ICE da retenção média de fluoresceína

Valor médio da pontuação de retenção de fluoresceína 30 minutos após o tratamento (*)	Classe ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Ver o quadro 2.

46. Para determinar a classificação global de irritação *in vitro* da substância em estudo, utiliza-se o quadro 6 para estabelecer a correspondência entre a classificação na escala de irritação e a combinação das categorias obtidas para o edema da córnea, a opacidade da córnea e a retenção de fluoresceína na córnea.

Quadro 6

Classificação global de irritação *in vitro*

Classificação	Combinações dos três parâmetros medidos
Corrosivo/Fortemente irritante	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Opacidade da córnea ≥ 3 aos 30 minutos (pelo menos 2 olhos) Opacidade da córnea = 4 em qualquer momento (pelo menos 2 olhos) Perda substancial de epitélio (pelo menos 1 olho)

(*) Combinações menos prováveis.

47. Como referido no ponto 1, se não for possível atribuir a uma substância a classificação de substância corrosiva ou fortemente irritante ocular, será necessário efectuar mais ensaios para efeitos de classificação e rotulagem. O método ICE tem as seguintes características no que respeita à identificação de substâncias corrosivas ou fortemente irritantes oculares: exactidão global de 83 % (120/144) a 87 % (134/154), taxa de falsos positivos de 6 % (7/122) a 8 % (9/116) e taxa de falsos negativos de 41 % (13/32) a 50 % (15/30), comparativamente aos dados obtidos pelo método de ensaio ocular *in vivo* no coelho, classificados de acordo com os sistemas de classificação EPA (1), UE (2) ou GHS (3). Excluindo da base de dados determinadas substâncias de certas classes químicas (álcoois e substâncias tensioactivas) ou físicas (sólidos), a exactidão do método ICE nos sistemas de classificação EPA, UE e GHS situa-se entre 91 % (75/82) e 92 % (69/75), a taxa de falsos positivos entre 5 % (4/73) e 6 % (4/70) e a taxa de falsos negativos entre 29 % (2/7) e 33 % (3/9) (4).

48. Mesmo que não seja possível atribuir à substância em estudo a classificação de corrosiva ou fortemente irritante ocular, os dados obtidos pelo método ICE podem ser úteis, em conjugação com dados de ensaios oculares *in vivo* no coelho ou de ensaios *in vitro* adequadamente validados, para melhor avaliar a utilidade e limitações do método de ensaio ICE na identificação de matérias não fortemente irritantes ou não-irritantes (está em curso a elaboração de um documento de orientações sobre a utilização de métodos de ensaio de toxicidade ocular *in vitro*)

▼M2

Critérios de aceitação do estudo

49. Considera-se o ensaio aceitável se as amostras de controlo negativas ou do veículo/solvente correspondentes e as amostras de controlo positivas correspondentes derem lugar a uma classificação de irritação nas classes não-irritante e corrosivo/fortemente irritante, respectivamente.

Relatório do ensaio

50. O relatório do ensaio deve incluir as informações seguintes que sejam pertinentes na realização do estudo em causa:

Substâncias em estudo e de controlo

Denominação ou denominações químicas, como a denominação estrutural utilizada pelo Chemical Abstracts Service (CAS), seguida de outras denominações, se existirem;

Número de registo CAS, se for conhecido;

Grau de pureza e composição da substância ou mistura (em percentagem ponderal), se forem conhecidas;

Propriedades físico-químicas (por exemplo, estado físico, volatilidade, pH, estabilidade, classe química, hidrossolubilidade) relevantes para a realização do estudo;

Pré-tratamento das substâncias em estudo/de controlo, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

Estabilidade, se for conhecida.

Informações relativas ao patrocinador e ao laboratório

Nome e endereço do patrocinador, do laboratório e do director do estudo;

Indicação da origem dos olhos (por exemplo, da instalação na qual foram colhidos);

Condições de armazenagem e de transporte dos olhos (data-hora da colheita dos olhos, tempo decorrido até ao início dos ensaios, etc.);

Se forem conhecidas, especificidades dos animais nos quais os olhos foram colhidos (idade, sexo, peso, etc. do animal dador).

Justificação do método de ensaio e do protocolo utilizados

Integridade do método de ensaio

Processo utilizado para garantir a integridade (exactidão e fiabilidade) do método de ensaio ao longo do tempo (por exemplo, ensaio periódico das substâncias para a demonstração de competência, utilização de dados históricos das amostras de controlo positivas e negativas, etc.).

Critérios de aceitação de um ensaio

Se for aplicável, intervalos aceitáveis das amostras de referência de controlo correspondentes, com base nos dados históricos.

Condições de ensaio

Descrição do sistema de ensaio utilizado;

Microscópio com lâmpada de fenda utilizado (modelo, etc.);

Regulações do microscópio com lâmpada de fenda utilizado;

Informações sobre as córneas de frango utilizadas, incluindo declarações sobre a qualidade das mesmas;

▼**M2**

Pormenores sobre a execução do ensaio;

Concentração ou concentrações das substâncias em estudo utilizadas;

Descrição de eventuais modificações na execução do ensaio;

Referência a dados históricos do modelo (amostras de controlo positivas e negativas, substâncias para a demonstração de competência, substâncias de referência, etc.);

Descrição dos critérios de avaliação utilizados.

Resultados

Descrição de outros efeitos eventualmente observados;

Se adequado, fotografias dos olhos;

Discussão dos resultados

Conclusões

REFERÊNCIAS

1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96--001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

2) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Directivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006, JO L 353 de 31.12.2008, p. 1.

3) United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Acessível em:

http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html

4) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Acessível em:

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

5) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Acessível em:

http://ecvam.jrc.it/index.htm

6) Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de Dezembro de 2006, relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH), que cria a Agência Europeia dos Produtos Químicos, que altera a Directiva 1999/45/CE e revoga o Regulamento (CEE) n.º 793/93 do Conselho e o Regulamento (CE) n.º 1488/94 da Comissão, bem como a Directiva 76/769/CEE do Conselho e as Directivas 91/155/CEE, 93/67/-CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE da Comissão. JO L 396 de 30.12.2006, p. 1.

7) OCDE (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Acessível em:

http://www.oecd.org/document/40/0, 2340, en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html

▼M2

8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. Em: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Acessível em:

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

9) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Acessível em:

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm

10) Prinsen, M. K. Koëter, B. W. M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

11) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Acessível em:

http://ecvam.jrc.it/index.htm

12) Balls, M., Botham, P. A., Bruner, L. H., Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

13) Prinsen, M. K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.

14) Chamberlain, M., Gad, S. C., Gautheron, P., Prinsen, M. K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/-prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

15) Siegel, J. D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Acessível em:

http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf

16) Maurer, J. K., Parker, R. D., Jester J. V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

17) Burton, A. B. G., M. York, R. S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 19:471-480.

▼**M2**

18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Acessível em:

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm

19) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Acessível em:

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm

▼M2

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exactidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida da eficiência do método e um dos aspectos da «adequação». Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados correctos do método de ensaio.

Substância de referência: Substância utilizada como padrão de comparação com a substância em estudo. Deve ter as seguintes propriedades: i) origem ou origens uniformes e fiáveis; ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo; iii) características físico-químicas conhecidas; iv) disponibilidade de dados sobre os efeitos conhecidos; e v) potência conhecida situada na gama de reacção pretendida.

Córnea: Parte transparente anterior do globo ocular que recobre a íris e a pupila e deixa passar a luz para o interior.

Opacidade da córnea: Medição do grau de opacidade da córnea depois de exposta à substância em estudo. Um aumento de opacidade da córnea é indicador de lesão da córnea.

Edema da córnea: Medição objectiva no ensaio ICE da dilatação da córnea após exposição à substância em estudo. É expressa em percentagem e calculada em relação às medições da linha de base de espessura da córnea efectuadas antes da aplicação da substância em estudo. A espessura é registada a intervalos regulares após exposição à matéria em estudo no ensaio ICE. O grau de edema da córnea é indicador do grau de lesão da córnea.

Categoria 1 EPA: Acção corrosiva (destruição irreversível do tecido ocular) ou afecção ou irritação da córnea que se mantêm durante mais de 21 dias (1).

Categoria R41 UE: Lesão do tecido ocular ou degradação grave da visão em consequência da aplicação da substância em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação (2).

Taxa de falsos negativos: Proporção das substâncias positivas que o método de ensaio considera erradamente negativas. É um dos indicadores de eficiência dos métodos de ensaio.

Taxa de falsos positivos: Proporção das substâncias negativas que o método de ensaio considera erradamente positivas. É um dos indicadores de eficiência dos métodos de ensaio.

Retenção de fluoresceína: Medição subjectiva no ensaio ICE da proporção de fluoresceína sódica que, após exposição à substância em estudo, é retida pelas células epiteliais da córnea. O grau de retenção da fluoresceína é indicador do grau de lesão do epitélio da córnea.

GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos): Sistema (designado em inglês por *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa com vista à protecção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência, etc.) e do ambiente (3).

▼M2

Categoria 1 GHS: Lesão do tecido ocular ou degradação grave da visão em consequência da aplicação da substância em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação (3).

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, susceptível de causar efeitos adversos num organismo, sistema ou (sub)população que lhe seja exposta.

Amostra de controlo negativa: Replicado não-tratado que contém todos os componentes do sistema de ensaio. Esta amostra é ensaiada juntamente com as amostras tratadas com a substância em estudo e as outras amostras de controlo, para determinar se o solvente interage com o sistema de ensaio.

Substância não-irritante: Substância não classificada nas categorias I, II ou III EPA nem nas categorias R41 ou R36 UE nem nas categorias 1, 2A ou 2B GHS de irritantes oculares (1) (2) (3).

Substância corrosiva ocular: a) Substância que provoca lesões irreversíveis dos tecidos do olho. b) Substância classificada na categoria 1 GHS, na categoria I EPA ou na categoria R41 UE de irritantes oculares (1) (2) (3).

Substância irritante ocular: a) Substância que, aplicada na superfície anterior do olho, provoca alterações reversíveis no olho. b) Substância classificada nas categorias II ou III EPA, na categoria R36 UE ou nas categorias 2A ou 2B GHS de irritantes oculares (1) (2) (3).

Substância fortemente irritante ocular: a) Substância que, aplicada na superfície anterior do olho, provoca lesões dos tecidos do mesmo que não são reversíveis nos 21 dias após a aplicação ou que provoca uma degradação grave da visão. b) Substância classificada na categoria 1 GHS, na categoria I EPA ou na categoria R41 UE de irritantes oculares (1) (2) (3).

Amostra de controlo positiva: Replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com uma substância que comprovadamente induz reacção positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade no tempo da reacção a esta amostra de controlo, essa reacção não deve ser excessivamente forte.

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial, bem como da repetibilidade intralaboratorial.

Microscópio com lâmpada de fenda: Instrumento utilizado para examinar directamente uma imagem estereoscópica saliente do olho com a ampliação de um microscópio binocular. No método de ensaio ICE, este instrumento é utilizado para observar as estruturas anteriores dos olhos de frango e para medir objectivamente a espessura da córnea com um dispositivo de medição de profundidade incorporado.

Amostra de controlo do solvente/veículo: Amostra não-tratada que contém todos os componentes do sistema de ensaio, incluindo o solvente ou veículo, e é ensaiada, juntamente com as amostras tratadas com a substância em estudo e as outras amostras de controlo, para estabelecer a linha de base de reacção para as amostras tratadas com a substância em estudo, dissolvida no mesmo solvente ou veículo. Quando ensaiada com uma amostra de controlo negativa correspondente, esta amostra também permite determinar se o solvente ou veículo interage com o sistema de ensaio.

▼M2

Ensaio por etapas: Estratégia sequencial de ensaio em que, seguindo uma ordem estabelecida, se avalia toda a informação disponível sobre a substância em estudo, por um processo baseado na ponderação da suficiência de prova em cada etapa, com o objectivo de determinar se existe informação suficiente para uma decisão de classificação de perigosidade antes de passar à etapa seguinte. Se a informação existente possibilitar a atribuição de um potencial de irritação à substância em estudo, não serão necessários mais ensaios. Se a informação existente não possibilitar a atribuição de um potencial de irritação à substância em estudo, proceder-se-á a uma série de ensaios sequenciais em animais até ser possível atribuir uma classificação inequívoca.

Método de ensaio validado: Método de ensaio relativamente ao qual foram concluídos estudos de validação com vista a determinar a adequação (incluída a exactidão) e fiabilidade para uma finalidade específica. É importante referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exacto e fiável para ser considerado aceitável para a finalidade pretendida.

Ponderação da suficiência da prova: Processo que consiste em ponderar os pontos fortes e os pontos fracos dos vários elementos de informação com vista a chegar-se a uma conclusão fundamentada sobre o potencial de perigosidade da substância.

▼M2

Apêndice 2

SUBSTÂNCIAS RECOMENDADAS PARA A DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA TÉCNICA NO MÉTODO DE ENSAIO EM OLHOS DE FRANGO ISOLADOS (ICE)

Antes de um método de ensaio conforme ao presente método passar a ser utilizado por rotina, os laboratórios podem pretender comprovar a sua competência técnica identificando correctamente a classificação de corrosividade ocular das dez substâncias recomendadas no quadro 1. Estas substâncias foram seleccionadas de modo a representarem a gama de reacções de irritação/corrosão ocular local obtida no ensaio ocular *in vivo* no coelho (TG 405) (ou seja, as categorias 1, 2A, 2B ou não classificado nem rotulado do sistema GHS da ONU (3) (7)). Porém, atendendo à utilização destes ensaios que se encontra validada (unicamente a identificação de substâncias corrosivas/fortemente irritantes oculares), apenas há que demonstrar competência em relação a dois resultados classificativos obtidos no ensaio (corrosivo/fortemente irritante ou não-corrosivo/não fortemente irritante). Outros critérios de selecção foram a disponibilidade da substância no comércio, a existência de dados de referência *in vivo* de alta qualidade e a existência de dados de alta qualidade relativos aos dois métodos *in vitro* para os quais estão a ser elaboradas directrizes de ensaio (*test guidelines*). Foi nesta base que se seleccionaram substâncias irritantes da lista recomendada pelo ICCVAM de 122 substâncias de referência para a validação de métodos de ensaio de toxicidade ocular *in vitro* (ver o apêndice H: *ICCVAM Recommended Reference Substances List*) (4). Os *Background Review Documents* do ICCVAM (18) (19) contêm dados de referência relativos aos métodos BCOP (método de ensaio de opacidade e permeabilidade da córnea em bovinos) e ICE.

Quadro 1

Substâncias recomendadas para a demonstração de competência técnica no método ICE

Substância química	N.º CAS (CASRN)	Classe química ([1])	Fase	Classificação *in vivo* ([2])	Classificação *in vitro* ([3])
Cloreto de benzalcónio (5 %)	8001-54-5	Sal de amónio quaternário	Líquida	Categoria 1	Corrosivo/Fortemente irritante
Clorexidina	55-56-1	Amina, Amidina	Sólida	Categoria 1	Corrosivo/Fortemente irritante
Ácido dibenzoil-L--tartárico	2743-38-6	Ácido carboxílico, Éster	Sólida	Categoria 1	Corrosivo/Fortemente irritante
Imidazole	288-32-4	Composto heterocíclico	Sólida	Categoria 1	Corrosivo/Fortemente irritante
Ácido tricloroacético (30 %)	76-03-9	Ácido carboxílico	Líquida	Categoria 1	Corrosivo/Fortemente irritante
Cloreto de 2,6-diclorobenzoílo	4659-45-4	Halogeneto de acilo	Líquida	Categoria 2A	Não-corrosivo/Não fortemente irritante
2-Metilacetoacetato de etilo	609-14-3	Cetona, Éster	Líquida	Categoria 2B	Não-corrosivo/Não fortemente irritante
Nitrato de amónio	6484-52-2	Sal inorgânico	Sólida	Categoria 2A	Não-corrosivo/Não fortemente irritante

▼**M2**

Substância química	N.º CAS (CASRN)	Classe química (1)	Fase	Classificação *in vivo* (2)	Classificação *in vitro* (3)
Glicerol	56-81-5	Álcool	Líquida	Não atribuída	Não-corrosivo/Não fortemente irritante
n-Hexano	110-54-3	Hidrocarboneto (acíclico)	Líquida	Não atribuída	Não-corrosivo/Não fortemente irritante

Abreviaturas: CASRN = Número de registo do Chemical Abstracts Service.

(1) As substâncias foram classificadas em classes químicas segundo um sistema normalizado, com base nos Medical Subject Headings («classificadores de temas médicos», MeSH) da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos da América (http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Com base nos resultados do ensaio ocular *in vivo* no coelho (TG 405 da OCDE) e no sistema GHS da ONU (3) (7).

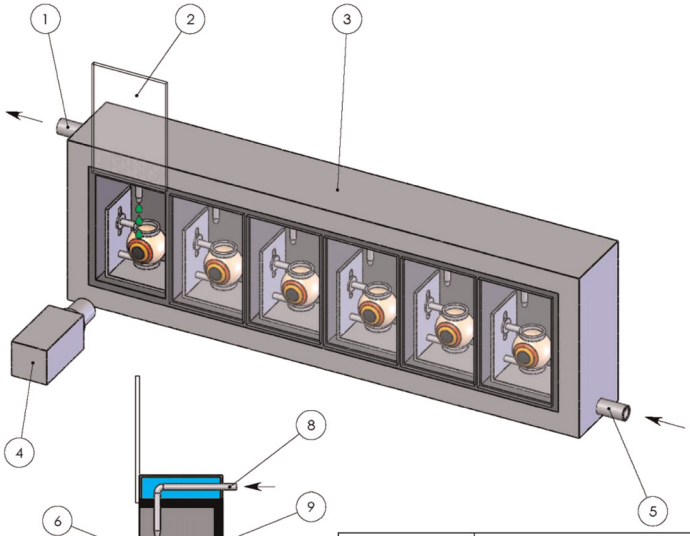
(3) Com base nos resultados obtidos pelos métodos BCOP e ICE.

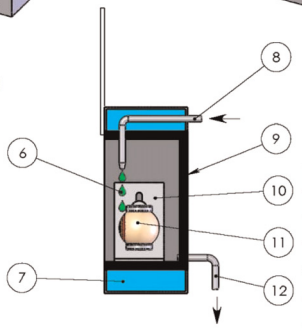
▼M2

Apêndice 3

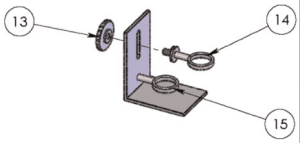
Diagramas dos suportes oculares e do aparelho de superfusão para o método ICE

(Ver em Burton et al. (17) uma descrição genérica dos suportes oculares e do aparelho de superfusão para o método ICE)





SECÇÃO DO COMPARTIMENTO



SUPORTE OCULAR

ITEM	DESCRIÇÃO
1	SAÍDA DE ÁGUA TÉPIDA
2	PORTINHOLA DESLIZANTE
3	APARELHO DE SUPERFUSÃO
4	INSTRUMENTO DE MEDIÇÃO ÓPTICA
5	ENTRADA DE ÁGUA TÉPIDA
6	SOLUÇÃO SALINA
7	ÁGUA TÉPIDA
8	ENTRADA DE SOLUÇÃO SALINA
9	COMPARTIMENTO
10	SUPORTE OCULAR
11	OLHO DE FRANGO
12	SAÍDA DE SOLUÇÃO SALINA
13	PARAFUSO DE REGULAÇÃO
14	BRAÇO SUPERIOR REGULÁVEL
15	BRAÇO INFERIOR FIXO

▼M3

B.49. ENSAIO *IN VITRO* DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

INTRODUÇÃO

1. O ensaio *in vitro* de micronúcleos é um ensaio de genotoxicidade para a deteção de micronúcleos no citoplasma de células em interfase. Os micronúcleos podem provir de fragmentos cromossómicos acêntricos (ou seja, sem centrómero) ou de cromossomas completos incapazes de migrar para os pólos durante a anáfase da divisão celular. O ensaio deteta a atividade de produtos químicos (substâncias e misturas) clastogénicos e aneugénicos (1) (2) em células que se tenham dividido durante ou após a exposição à substância em estudo. Este método de ensaio admite a utilização de protocolos que recorrem ou não ao inibidor de polimerização da actina «citocalasina B». A adição de citocalasina B antes da mitose visada permite a identificação e a análise seletiva da frequência de micronúcleos nas células que sofreram uma mitose, visto que são células binucleadas (3) (4). Este método de ensaio também admite a utilização de protocolos sem a parte de citocinese, desde que a população celular analisada tenha comprovadamente sofrido mitose.

2. Além da utilização do ensaio *in vitro* de micronúcleos para identificar produtos químicos (substâncias e misturas) indutores da formação de micronúcleos, o recurso ao bloqueio da citocinese, à marcação imunoquímica dos cinetócoros ou à hibridação com sondas centroméricas/teloméricas (hibridação fluorescente *in situ* ou «FISH») pode também fornecer informações sobre os mecanismos de indução de danos cromossomáticos e de formação de micronúcleos (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). É possível recorrer-se à marcação ou à hibridação referidas sempre que se verifique um aumento da formação de micronúcleos e o investigador pretenda determinar se este se deve a clastogénese, a aneugénese ou a ambas.

3. Os micronúcleos representam danos transmitidos às células-filhas, ao passo que as aberrações cromossomáticas contadas nas células em metáfase podem não ser transmitidas. Uma vez que é possível determinar, com relativa objetividade, os micronúcleos das células em interfase, o pessoal do laboratório apenas precisa de determinar se as células se dividiram ou não e quantas contêm micronúcleos. Por conseguinte, as contagens das preparações podem ser feitas com relativa rapidez e as análises podem ser automatizadas. É assim possível efetuar contagens a milhares – e já não centenas – de células por tratamento, aumentando as potencialidades do ensaio. Por outro lado, uma vez que podem formar-se micronúcleos devido a cromossomas que ficam para trás («*lagging*»), é possível detetar agentes indutores de aneuploidia, que são difíceis de estudar em ensaios convencionais de aberrações cromossomáticas, por exemplo, o *Test Guideline* 473 da OCDE (capítulo B.10 deste anexo) (17). Todavia, sem recurso a técnicas especiais, como o método FISH referido no ponto 2, o ensaio *in vitro* de micronúcleos não permite distinguir os produtos químicos indutores de poliploidia dos indutores de clastogenicidade.

4. O ensaio *in vitro* de micronúcleos utiliza normalmente células de cultura, humanas ou de roedores. O método proporciona uma base alargada para a investigação *in vitro* de potenciais de indução de danos cromossomáticos, pois permite detetar aneugénios e clastogénios.

5. O ensaio *in vitro* de micronúcleos funciona bem numa grande variedade de tipos de células, na presença ou na ausência de citocalasina B. Há numerosos dados que confirmam a validade deste ensaio com várias linhagens de células de roedores (CHO, V79, CHL/IU e L5178Y) e de linfócitos humanos (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). É o caso, nomeadamente, dos estudos internacionais de validação coordenados pela *Société Française de Toxicologie Génétique* (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) e dos relatórios do *International Workshop on Genotoxicity Testing* (4) (16). Os dados disponíveis foram também reavaliados num estudo de validação retrospetivo de suficiência de prova efetuado pelo

▼M3

Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) da Comissão Europeia, tendo o ESAC (Comité Científico Consultivo do ECVAM) (32) (33) (34) considerado o método de ensaio cientificamente válido. Embora não tenham sido utilizadas nos estudos de validação, está descrita a utilização da linhagem de linfoblastóides humanos TK6 (35), de células HepG2 (36) (37) e de células embrionárias primárias de hámster sírio (*Mesocricetus auratus*) (38).

DEFINIÇÕES

6. As definições utilizadas figuram no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. Os ensaios *in vitro* necessitam, normalmente, de uma fonte exógena de ativação metabólica, a menos que as células sejam metabolicamente competentes em relação às substâncias em estudo. O sistema exógeno de ativação metabólica não reproduz inteiramente as condições *in vivo*. Deve ter-se também o cuidado de evitar condições passíveis de gerarem resultados falsos positivos que não sejam reflexo de mutagenicidade intrínseca, mas que possam resultar, por exemplo, de fatores como mudanças pronunciadas do pH ou da pressão osmótica, bem como de níveis elevados de citotoxicidade (39) (40) (41). Se a adição do produto químico em estudo modificar o pH do meio, este deve ser regulado, de preferência tamponando a solução de reserva, a fim de que o volume seja sempre o mesmo, sejam quais forem as concentrações em estudo e os controlos utilizados.

8. Para analisar a indução de micronúcleos, é essencial que tanto as culturas tratadas como as culturas não tratadas tenham sofrido mitose. A etapa mais informativa para a contagem de micronúcleos corresponde às células que tenham sofrido uma mitose durante ou após o tratamento com a substância em estudo.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

9. Expõem-se culturas de células humanas ou de mamíferos à substância em estudo, juntamente com uma fonte exógena de ativação metabólica e sem essa fonte, a menos que se utilizem células com capacidade metabólica adequada. Incluem-se em todos os ensaios, em paralelo, produtos químicos de controlo positivo e controlos do solvente/excipiente.

10. Durante ou após a exposição à substância em estudo, cultivam-se as células por um período suficiente para que ocorram danos nos cromossomas ou nos fusos que levem à formação de micronúcleos nas células em interfase. Para indução de aneuploidia, a substância em estudo deve normalmente estar presente durante a mitose. Colhem-se células em interfase, coloram-se e analisam-se, para pesquisar a presença de micronúcleos. Idealmente, só devem contar-se micronúcleos em células que tenham sofrido mitose completa durante a exposição à substância em estudo ou durante o período pós-exposição, caso exista. Para o efeito, nas culturas que tenham sido tratadas com um bloqueador da citocinese, a contagem só é feita nas células binucleadas. Na ausência de um bloqueador da citocinese, é importante demonstrar a probabilidade elevada de que as células analisadas se tenham dividido durante ou após a exposição à substância em estudo. Em todos os protocolos, é importante demonstrar a ocorrência de proliferação celular tanto nas culturas tratadas como nas culturas de controlo, procedendo-se à contagem de micronúcleos para determinar o grau de citotoxicidade ou de citóstase induzido pela substância em estudo nas culturas (ou culturas em paralelo).

▼M3

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Preparação

11. Podem utilizar-se linfócitos primários cultivados de sangue humano periférico (5) (19) (42) (43) e uma série de linhagens celulares de roedores, como CHO, V79, CHL/IU e L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Se forem utilizadas outras linhagens celulares ou outros tipos de células, será necessário justificá-lo com base no seu desempenho comprovado no ensaio, em conformidade com a secção «Critérios de aceitabilidade». Uma vez que a frequência de fundo de micronúcleos influencia a sensibilidade do ensaio, recomenda-se a utilização de tipos de células cuja frequência de fundo de formação de micronúcleos seja baixa e estável.

12. Os linfócitos de sangue humano periférico devem provir de indivíduos jovens (18 a 35 anos), saudáveis e não fumadores, em relação aos quais não haja notícia de terem estado expostos recentemente a radiações ou produtos químicos genotóxicos. Se forem reunidas para utilização células de mais do que um dador, deve indicar-se o número de dadores. A frequência de micronúcleos aumenta com a idade, sendo esta tendência mais pronunciada no sexo feminino do que no sexo masculino (44), o que deve ser tido em conta na seleção de células de dadores para um banco de células.

Meios e condições de cultura

13. Devem manter-se as culturas em meios de cultura e condições de incubação adequados, no que respeita ao tipo de recipiente, à concentração de CO_2, à temperatura e à humidade. As linhagens celulares e estirpes estabelecidas devem ser periodicamente verificadas quanto à estabilidade do número modal de cromossomas e à ausência de contaminação por micoplasmas, não devendo ser utilizadas se se verificar que foram contaminadas ou que o número modal de cromossomas se alterou. Deve conhecer-se o tempo normal do ciclo celular nas condições de cultivo utilizadas no laboratório. Caso se recorra ao método do bloqueio da citocinese, deve otimizar-se a concentração do inibidor de citocinese para o tipo de célula em causa e demonstrar-se que a mesma produz um bom rendimento de células bionucleadas para contagem.

Preparação das culturas

14. Linhagens e estirpes de células estabelecidas: repicam-se células de culturas de reserva, inoculam-se num meio de cultura, com uma densidade que evite a confluência das colónias, no caso das monocamadas, ou de modo a não se atingirem densidades excessivas antes da colheita, no caso das culturas em suspensão, e incuba-se a 37 °C.

15. Linfócitos: cultiva-se sangue integral, tratado com um anticoagulante (por exemplo, heparina), ou linfócitos separados, na presença de um agente mitogénico (por exemplo, fito-hemaglutinina – PHA), antes da exposição à substância em estudo e à citocalasina B.

Ativação metabólica

16. Se forem utilizadas células com capacidade metabólica endógena inadequada, será necessário utilizar sistemas metabolizantes exógenos. O sistema mais geralmente utilizado é uma fração pós-mitocondrial reforçada com cofator (S9), preparada a partir de fígados de roedores tratados com agentes de indução enzimática, por exemplo, Aroclor 1254 (45) (46), ou uma mistura de fenobarbitona e β-naftoflavona (46) (47) (48) (49). Esta última combinação não é contrária à Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (50) nem ao Regulamento (CE) n.º 850/2004 relativo a poluentes orgânicos persistentes (66) e comprovou-se ser tão eficaz na indução de oxidases de função mista como o Aroclor 1254 (46) (47) (48) (49). A fração S9 é habitualmente utilizada em concentrações na gama dos 1 % a 10 % (v/v) no meio de ensaio final. O estado do sistema de ativação metabólica pode depender da classe do produto químico em estudo. Em alguns casos, pode revelar-se adequado utilizar várias concentrações da fração S9.

▼M3

17. As células utilizadas no estudo podem provir de linhagens celulares modificadas por engenharia genética que exprimam enzimas de ativação específicos, humanos ou de roedores, e dispensem, assim, um sistema de ativação metabólica exógeno. Nesses casos, a escolha das linhagens celulares utilizadas terá de ser justificada cientificamente – por exemplo, pela adequação das oxidases de função mista ao metabolismo da substância em estudo (51) e pela resposta das mesmas a clastogénios e aneugénios conhecidos (ver a secção «Critérios de aceitabilidade»). Deve ter-se presente que a substância em estudo pode não ser metabolizada pela(s) oxidase(s) de função mista expressa(s), caso no qual a ocorrência de resultados negativos não indicaria que a substância em estudo não é indutora de micronúcleos.

Preparação da substância em estudo

18. Os produtos químicos sólidos devem ser dissolvidos em solventes ou excipientes adequados e, se necessário, ser diluídos antes do tratamento das células. Os produtos químicos líquidos podem ser adicionados diretamente aos sistemas em estudo e/ou ser diluídos antes do tratamento. Para o ensaio de gases e produtos químicos voláteis, devem efetuar-se alterações adequadas aos protocolos normalizados, como o tratamento em recipiente fechado (52) (53). Devem utilizar-se preparações frescas da substância em estudo, a menos que haja dados de estabilidade que demonstrem a aceitabilidade do seu armazenamento.

Condições de ensaio

Solventes/excipientes

19. O solvente/excipiente não deve reagir com a substância em estudo nem ser incompatível com a sobrevivência das células ou com a manutenção da atividade da fração S9 à concentração utilizada. Caso se utilizem solventes/excipientes cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas (em vez de, por exemplo, água, meio de cultura celular ou sulfóxido de dimetilo), devem fornecer-se dados que comprovem a respetiva compatibilidade com a substância em estudo e a inexistência de genotoxicidade por parte do mesmo. Recomenda-se, sempre que possível, a utilização prioritária de solventes/excipientes aquosos.

Utilização de citocalasina B como bloqueador da citocinese

20. Um dos aspetos mais importantes a ponderar no desempenho do ensaio *in vitro* de micronúcleos é a necessidade de garantir que as células sujeitas à contagem sofreram mitose durante o tratamento ou durante o período de incubação após o tratamento, caso exista. A citocalasina B tem sido o agente mais utilizado para bloquear a citocinese, pois inibe a agregação da actina e impede assim a separação das células-filhas após a mitose, conduzindo à formação de células binucleadas (5) (54) (55). Pode, deste modo, circunscrever-se a contagem de micronúcleos às células que sofreram mitose durante ou após o tratamento. Pode medir-se simultaneamente o efeito da substância em estudo na cinética da proliferação celular. Quando se utilizam linfócitos humanos, é necessário recorrer a citocalasina B como bloqueador da citocinese, porque, caso contrário, os tempos do ciclo celular variariam de cultura para cultura e de dador para dador e nem todos os linfócitos responderiam ao PHA. Têm sido utilizados outros métodos – que são objeto do ponto 26 –, no ensaio de linhagens celulares, para determinar se as células sujeitas à contagem se dividiram.

21. O laboratório determina, para cada tipo de célula, a concentração necessária de citocalasina B para otimizar a frequência de células binucleadas nas culturas de controlo do solvente/excipiente. A concentração adequada de citocalasina B situa-se normalmente entre 3 e 6 μg/ml.

▼M3

Medição da proliferação celular e da citotoxicidade e escolha das concentrações de exposição

22. Ao determinar a concentração máxima a ensaiar da substância em estudo, devem evitar-se concentrações capazes de gerar respostas falsas positivas, como as que produzam citotoxicidade excessiva, precipitações no meio de cultura e alterações pronunciadas do pH ou da pressão osmótica (39) (40) (41).

23. Efetuam-se medições da proliferação celular para garantir que as células tratadas sofreram mitose durante o ensaio e que os tratamentos são efetuados a níveis adequados de citotoxicidade (ver o ponto 29). Se não se utilizar citocalasina B, determina-se a citotoxicidade com e sem ativação metabólica, nas células que exijam essa ativação, calculando o aumento relativo da contagem celular (RICC) ou a duplicação da população em termos relativos (RPD) – ver as fórmulas no apêndice 2. Caso se utilize citocalasina B, pode determinar-se a citotoxicidade calculando o índice de replicação (IR) – ver a fórmula no apêndice 2.

24. O tratamento das culturas com citocalasina B e a determinação das frequências relativas de células mononucleadas, binucleadas e plurinucleadas na cultura celular constituem um método rigoroso de quantificação do efeito do tratamento na proliferação celular e da atividade citotóxica e citostática do mesmo (5), garantindo que apenas são contadas células que se dividiram durante ou após o tratamento.

25. Nos estudos com citocalasina B, a atividade citotóxica/citostática pode quantificar-se com base no índice de proliferação com bloqueio da citocinese (CBPI) (5) (26) (56) ou ser determinada a partir do índice de replicação (IR) de, pelo menos, 500 células por cultura (ver as fórmulas no apêndice 2). Quando se utiliza citocalasina B para determinar a proliferação celular, o cálculo do CBPI ou do IR deve basear-se em, pelo menos, 500 células por cultura. A determinação destes parâmetros, entre outros, pode ser utilizada para estimar a citotoxicidade, comparando os valores correspondentes às culturas tratadas e de controlo. A avaliação de outros indicadores de citotoxicidade (grau de confluência, número de células, apóptoses, necroses, contagem das células em metáfase, etc.) pode fornecer informações úteis.

26. Nos estudos em que não se recorra à citocalasina B, é necessário demonstrar que as células contadas na cultura sofreram divisão durante ou após o tratamento com a substância em estudo, pois, caso contrário, podem surgir respostas falsas negativas. Entre os métodos que têm sido utilizados para garantir que a contagem incide em células que se dividiram contam-se a incorporação e a deteção subsequente de bromodesoxiuridina (BrdU), para identificar as células que se replicaram (57), a formação de clones, quando se tratam e contam *in situ*, numa lâmina de microscópio, células de linhagens permanentes – índice de proliferação (IP) – (25) (26) (27) (28), a medição da duplicação da população em termos relativos (RPD) ou do aumento relativo da contagem celular (RICC) e outros métodos de eficácia comprovada (16) (56) (58) (59) (ver as fórmulas no apêndice 2). A avaliação de outros indicadores de citotoxicidade ou de citóstase (grau de confluência, número de células, apóptoses, necroses, contagem das células em metáfase, etc.) pode fornecer informações úteis.

27. Devem avaliar-se, pelo menos, três concentrações de ensaio analisáveis. Para isso, pode ser necessário efetuar o ensaio utilizando um número maior de concentrações próximas e examinar a formação de micronúcleos nas concentrações que proporcionem a gama apropriada de citotoxicidades. Alternativamente, pode efetuar-se um ensaio preliminar de citotoxicidade, para reduzir o intervalo a utilizar no ensaio definitivo.

28. A concentração mais elevada deve gerar 55 % ± 5 % de citotoxicidade. Níveis mais elevados podem induzir, como efeito secundário da citotoxicidade, danos cromossomáticos (60). Caso esta ocorra, as concentrações escolhidas para o ensaio devem abranger a gama compreendida entre a concentração que produz 55 % ± 5 % de citotoxicidade e uma concentração que gere pouca ou nenhuma citotoxicidade.

▼M3

29. Se não se observar citotoxicidade nem precipitação, a maior concentração ensaiada deve corresponder à menor das seguintes concentrações: 0,01 M, 5 mg/ml ou 5 μl/ml. As concentrações escolhidas para análise devem, normalmente, estar separadas por um intervalo não superior a 10. No caso das substâncias cuja curva de resposta à concentração tenha um declive acentuado, pode ser necessário aproximar mais as concentrações da substância em estudo, a fim de se contarem também culturas sujeitas a toxicidade moderada e baixa.

30. Se a solubilidade constituir um fator limitante, a concentração máxima, caso o limite não seja imposto pela citotoxicidade, deve ser a menor concentração à qual se observe precipitação nas culturas, devendo esta ser mínima e não interferir na contagem. A avaliação da precipitação deve ser feita por métodos como a microscopia ótica, procurando detetar-se a persistência de precipitados (no final do tratamento) ou a formação de precipitados durante a cultura.

Controlos

31. Cada experiência deve incluir, em paralelo, controlos positivos e do solvente/excipiente, com e sem ativação metabólica.

32. São necessários controlos positivos para comprovar a capacidade das células e do protocolo de ensaio utilizados para identificar clastogénios e aneugénios e para garantir a capacidade metabólica da preparação S9. Devem utilizar-se no controlo positivo indutores reconhecidos da formação de micronúcleos, a concentrações que previsivelmente produzirão aumentos pequenos, mas reprodutíveis, em relação à linha de base e comprovarão a sensibilidade do sistema de ensaio. As concentrações do controlo positivo devem ser escolhidas de modo que os seus efeitos sejam claros, mas não permitam à pessoa que procede às leituras identificar imediatamente as lâminas codificadas.

33. Deve utilizar-se um clastogénio que necessite de ativação metabólica (por exemplo, ciclofosfamida ou benzo[*a*]pireno) para demonstrar a competência metabólica e a capacidade de deteção de clastogénios do sistema de ensaio. Caso se justifique, poderão ser utilizados outros controlos positivos. Uma vez que algumas substâncias de controlo positivo que necessitam de ativação metabólica podem ativar-se, sem recurso a fatores exógenos, em determinadas condições de tratamento ou com determinadas linhagens celulares, deve pesquisar-se a necessidade de ativação metabólica e a atividade da preparação S9 na linhagem celular escolhida e às concentrações selecionadas.

34. Presentemente, não se conhecem aneugénios que necessitem de ativação metabólica para manifestarem atividade genotóxica (16). A colchicina e a vimblastina são dois exemplos de substâncias atualmente aceites para controlo positivo da atividade aneugénica. Podem utilizar-se outros produtos químicos cuja indução de micronúcleos se deva apenas, ou essencialmente, à atividade aneugénica. Para evitar a necessidade de dois controlos positivos – de clastogenicidade e de aneugenicidade – sem ativação metabólica, o controlo de aneugenicidade pode servir de controlo positivo sem S9 e o controlo de clastogenicidade pode servir para verificar a adequação do sistema de ativação metabólica utilizado. No caso das células que não necessitem de S9, deve utilizar-se um controlo positivo para a clastogenicidade e outro para a aneugenicidade. Figuram no apêndice 3 algumas sugestões de produtos químicos de controlo positivo.

35. Se estiverem disponíveis produtos químicos adequados, é admissível a utilização de controlos positivos específicos das classes químicas correspondentes. Todos os produtos químicos de controlo positivo utilizados devem adequar-se ao tipo de célula e às condições de ativação em causa.

▼M3

36. Devem incluir-se controlos do solvente/excipiente para cada período transcorrido até à colheita. Também deve incluir-se um controlo negativo (sem solvente/excipiente), não-tratado, a menos que estejam publicados dados ou que o laboratório disponha de dados históricos de controlo demonstrativos de que, às concentrações do solvente escolhido utilizadas, este não induz efeitos genotóxicos nem outros efeitos deletérios.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Esquema de tratamento

37. A fim de maximizar a probabilidade de deteção de ações aneugénicas ou clastogénicas num determinado estádio do ciclo celular, é importante tratar com a substância em estudo um número suficiente de células em todos os estádios do respetivo ciclo celular. O esquema de tratamento aplicado às linhagens celulares e às culturas de células primárias pode, portanto, diferir um pouco do aplicado aos linfócitos, que necessitam de estimulação mitogénica para iniciarem o seu ciclo celular. Este assunto é tratado nos pontos 41 a 43 (16).

38. De acordo com modelos teóricos e dados publicados (18), a maioria dos aneugénios e dos clastogénios é detetada com um tratamento curto durante três a seis horas, na presença ou ausência de S9, seguido da remoção da substância em estudo e de um período de cultura de 1,5 a 2,0 ciclos celulares (6). Procede-se à colheita de células decorrido um período correspondente a cerca de 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais (isto é, sem tratamento) após o início ou o termo do tratamento (ver o quadro 1). A cronologia da colheita das células e os tempos de recuperação podem ser dilatados, caso se saiba ou se suspeite que a substância em estudo afeta a duração do ciclo celular (por exemplo, ao ensaiar compostos nucleosídicos).

39. Devido à citotoxicidade potencial das preparações de S9 para as culturas de células de mamíferos, só na ausência deste se dilata o tempo de tratamento a um período correspondente a 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais. No caso desse tratamento prolongado, apresentam-se duas possibilidades de tratamento das células com o produto químico em estudo, na ausência ou na presença de citocalasina B. Essas possibilidades alternativas destinam-se a superar as situações em que se tema a eventual interação da substância em estudo com a citocalasina B.

40. Os esquemas propostos para o tratamento das células apresentam-se no quadro 1. Estes esquemas de tratamento gerais podem ser alterados em função da estabilidade ou reatividade da substância em estudo, ou das especificidades de crescimento das células utilizadas. Os tratamentos devem começar e terminar sempre durante a fase de crescimento exponencial das células. Para informações mais pormenorizadas sobre estes esquemas de tratamento, ver os pontos 41 a 47.

Quadro 1

Tratamento das células e cronologia da colheita de células no ensaio *in vitro* de micronúcleos

Linfócitos, células primárias e linhagens celulares tratados com citocalasina B	+ S9	Tratamento de três a seis horas, na presença de S9; Remoção do S9 e do meio de tratamento; Adição de meio fresco e de citocalasina B; Colheita após 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais.
	– S9 Exposição curta	Tratamento de três a seis horas; Remoção do meio de tratamento; Adição de meio fresco e de citocalasina B; Colheita após 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais.

▼M3

	– S9 Exposição prolongada	*Opção A:* Tratamento durante 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais, na presença de citocalasina B; Colheita no termo do período de exposição; *Opção B:* Tratamento durante 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais; Remoção da substância em estudo; Adição de meio fresco e de citocalasina B; Colheita após 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais.
Linhagens celulares tratadas sem citocalasina B (Procede-se de modo idêntico ao acima descrito, exceto que não se adiciona citocalasina B.)		

Linfócitos, células primárias e linhagens celulares tratadas com citocalasina B

41. Relativamente aos linfócitos, a melhor prática é iniciar a exposição à substância em estudo 44 a 48 horas após a estimulação com PHA, quando tiver desaparecido a sincronização de ciclos (5). No ensaio inicial, tratam-se as células durante três a seis horas com a substância em estudo, na ausência e na presença de S9. Remove-se o meio de tratamento e substitui-se este por meio fresco, ao qual se juntou citocalasina B. Procede-se à colheita de células depois de decorrido o período correspondente a 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais.

42. Se ambos os ensaios iniciais de tratamento curto (três a seis horas) derem resultados negativos ou inconclusivos, procede-se, a seguir, a um tratamento sem S9 com um período de exposição dilatado. Existem duas possibilidades de tratamento com o mesmo grau de aceitabilidade. Todavia, pode ser mais adequado seguir a opção A no caso dos linfócitos estimulados, cujo crescimento exponencial pode registar um abrandamento 96 horas após a estimulação. Por outro lado, no caso da opção B, as culturas de células não devem ainda coalescer quando da colheita de células final.

— Opção A: Tratamento das células com a substância em estudo durante 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais; colheita de células no final do tempo de tratamento.

— Opção B: Tratamento das células com a substância em estudo durante 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais. Remoção do meio de tratamento e substituição deste por meio fresco; colheita de células depois de transcorridos 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais suplementares.

43. O tratamento de células primárias e de linhagens celulares é idêntico ao descrito para os linfócitos, exceto que não é necessário estimulá-los com PHA durante 44 a 48 horas. As células que não sejam linfócitos devem ser expostas de maneira que, no final do estudo, o seu crescimento ainda seja exponencial.

Linhagens celulares tratadas sem citocalasina B

44. Tratam-se as células durante três a seis horas, na ausência e na presença de S9. Remove-se o meio de tratamento e substitui-se este por meio fresco. Procede-se à colheita de células depois de decorrido o período correspondente a 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais.

▼M3

45. Se ambos os ensaios iniciais de tratamento curto (três a seis horas) derem resultados negativos ou inconclusivos, procede-se a seguir a um tratamento (sem S9) com um período de exposição dilatado. Existem duas possibilidades de tratamento com o mesmo grau de aceitabilidade:

— Opção A: Tratamento das células com a substância em estudo durante 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais; colheita de células no final do tempo de tratamento.

— Opção B: Tratamento das células com a substância em estudo durante 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais. Remoção do meio de tratamento e substituição deste por meio fresco; colheita de células depois de decorridos 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais.

46. No final do tratamento de três a seis horas, podem estar presentes células mitóticas em monocamadas (identificáveis pela sua forma arredondada e por se destacarem da superfície). Por se destacarem com facilidade, estas células podem perder-se quando da remoção do meio com a substância em estudo. Devem tomar-se as precauções necessárias para recolher essas células ao lavar as culturas e para as repor com estas, de modo a evitar perdas de células que se encontrem em mitose, e eventualmente em processo de formação de micronúcleos, no processo de colheita de células.

Número de culturas

47. Devem utilizar-se culturas em duplicado para cada concentração da substância em estudo, assim como para o excipiente/solvente e o controlo negativo. Quando os dados históricos do laboratório mostrarem que a diferença entre os duplicados das culturas é mínima, admite-se a utilização de uma só cultura. Nesse caso, recomenda-se a análise de mais concentrações.

Colheita de células e preparação das lâminas

48. As células de cada cultura são colhidas e manipuladas separadamente. A preparação das células pode incluir um tratamento hipotónico, mas tal não é necessário de for possível obter uma dilatação adequada das células por outra via. Podem utilizar-se várias técnicas na preparação das lâminas, desde que se obtenham preparações celulares de alta qualidade para a contagem. Deve conservar-se o citoplasma das células, a fim de possibilitar a deteção dos micronúcleos e (no método com bloqueio da citocinese) uma identificação fiável das células binucleadas.

49. A coloração das lâminas pode fazer-se por vários métodos, por exemplo, com o corante Giemsa ou corantes fluorescentes específicos do ADN. A utilização de um corante específico do ADN – por exemplo, laranja de acridina (61) ou uma combinação do corante 33258 da Hoechst e de pironina-Y (62) – pode eliminar alguns erros associados à utilização de corantes inespecíficos do ADN. Se houver interesse em obter informações sobre os mecanismos de formação dos micronúcleos, podem utilizar-se na identificação do conteúdo destes (cromossomas/fragmentos de cromossomas) anticorpos anticinetócoros, o método FISH com sondas pancentroméricas de ADN ou a marcação *in situ* com iniciadores pancentroméricos específicos, em combinação com uma coloração de contraste adequada do ADN (15) (16). Na diferenciação entre clastogénios e aneugénios, podem utilizar-se outros métodos cuja eficácia tenha sido demonstrada.

Análise

50. Antes da análise microscópica, codificam-se todas as lâminas independentemente, incluindo as do solvente/excipiente e as dos controlos. Outra possibilidade de análise das amostras codificadas consiste em utilizar um sistema automático validado de análise de imagens, ou de citometria em fluxo.

▼M3

51. Nas culturas de células tratadas com citocalasina B, analisa-se a frequência de micronúcleos em, pelo menos, 2 000 células binucleadas por concentração (havendo duas culturas por concentração, examinam-se no mínimo 1 000 células binucleadas por cultura). Se houver apenas uma cultura por concentração, deve proceder-se à contagem em, pelo menos, 2 000 células binucleadas dessa cultura. Se o número de células disponível para contagem, em cada concentração, for substancialmente inferior a 1 000 células binucleadas por cultura – ou substancialmente inferior a 2 000 células binucleadas, se houver apenas uma cultura – e não se detetar um aumento significativo de micronúcleos, deve repetir-se o ensaio, utilizando mais células ou a concentrações menos tóxicas, conforme seja mais conveniente. Devem ser tomadas precauções para não se contarem células binucleadas com formas irregulares ou cujos núcleos tenham dimensões muito diferentes. Também não devem tomar-se células plurinucleadas com dilatação insuficiente por células binucleadas. Não devem pesquisar-se micronúcleos em células com mais de dois núcleos principais, cuja frequência normal de micronúcleos pode ser mais elevada (63) (64). Admite-se a contagem em células mononucleadas se a substância em estudo interferir comprovadamente com a atividade da citocalasina B.

52. Nas linhagens celulares ensaiadas sem tratamento com citocalasina B, procede-se à contagem de micronúcleos em, pelo menos, 2 000 células por concentração (havendo duas culturas por concentração, examinam-se no mínimo 1 000 células binucleadas por cultura). Se houver apenas uma cultura por concentração, deve proceder-se à contagem em, pelo menos, 2 000 células dessa cultura.

53. Quando se utiliza citocalasina B, devem utilizar-se, pelo menos, 500 células por cultura para calcular o CBPI ou o índice de replicação, a fim de determinar a proliferação celular (ver o apêndice 2). Se os tratamentos forem efetuados sem citocalasina B, é essencial demonstrar que as células contadas passaram pelo processo de proliferação, como se referiu nos pontos 24 a 27.

Critérios de aceitabilidade

54. Os laboratórios que pretendam utilizar o ensaio *in vitro* de micronúcleos descrito no presente método devem demonstrar ser capazes de detetar, com fiabilidade e exatidão, produtos químicos com atividade aneugénica ou clastogénica reconhecida, com ou sem ativação metabólica, bem como produtos químicos com reação reconhecidamente negativa, utilizando os produtos químicos de referência do apêndice 3. Como prova de capacidade de execução do presente método, caso o ensaio seja realizado sem adição de citocalasina B, o laboratório deve demonstrar que as células nas quais se efetua a contagem de micronúcleos completaram uma divisão celular.

55. Recomendam-se como produtos de referência os produtos químicos indicados no apêndice 3. Podem substituir-se produtos químicos da lista, ou nela incluir outros, se a atividade desses produtos for conhecida, se induzirem a formação de micronúcleos pelos mesmos mecanismos de ação e também se forem comprovadamente adequados aos produtos químicos a ensaiar pelo método de ensaio *in vitro* de micronúcleos. A justificação a apresentar pode incluir um estudo de validação com uma vasta gama de substâncias ou centrado numa gama mais estreita, baseada na classe química da substância ou no mecanismo indutor de danos em estudo.

56. As frequências de micronúcleos no controlo do solvente/excipiente e nas culturas não tratadas devem ser constantemente baixas e reprodutíveis (normalmente 5 a 25 micronúcleos por milhar de células, para os tipos de células referidos no ponto 11). Outros tipos de células podem apresentar outras gamas de resposta, a determinar no processo de validação dos mesmos para o método de ensaio *in vitro* de micronúcleos. Os dados dos controlos positivo, negativo e do solvente devem ser utilizados para estabelecer gamas históricas para os controlos. Esses valores são utilizados para decidir se um controlo negativo/positivo efetuado em paralelo é ou não adequado a uma determinada experiência.

▼M3

57. Se forem propostas pequenas alterações do protocolo para o ensaio (por exemplo, recurso a técnicas automáticas de contagem, em vez de técnicas não automáticas, ou utilização de um novo tipo de células), o protocolo modificado só pode considerar-se aceitável depois de se demonstrar que a alteração é adequada. Essa demonstração inclui prova da possibilidade de detetar os principais mecanismos de cisão, aquisição ou perda cromossomática, bem como de obter resultados positivos e negativos adequados para a classe da substância – ou a gama alargada de substâncias – a estudar.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

58. Se for utilizada a técnica do bloqueio da citocinese, a avaliação da indução de micronúcleos deve basear-se apenas na frequência de células binucleadas que possuam micronúcleos, independentemente do número de micronúcleos por célula. A contagem do número de células com um, dois ou mais micronúcleos pode fornecer informações úteis, mas não é obrigatória.

59. Também devem ser medidas, em paralelo, a citotoxicidade e/ou a citóstase em todas as culturas tratadas e nas culturas de controlo do solvente/excipiente (58). Para medir o atraso do ciclo celular quando se recorre ao método do bloqueio da citocinese, calcula-se o CBPI e o índice de replicação de todas as culturas tratadas e de controlo. Se não se adicionar citocalasina B, determina-se a duplicação da população em termos relativos (RPD), o aumento relativo da contagem celular (RICC) ou o índice de proliferação (PI) – ver o apêndice 2.

60. Os dados devem ser fornecidos por cultura e resumidos em quadros.

61. A indução de micronúcleos, por produtos químicos com esse efeito, nos ensaios *in vitro* pode dever-se a cisão ou perda cromossomática ou a ambos os efeitos. Para aprofundar se o mecanismo da indução de micronúcleos se deve a uma atividade clastogénica e/ou aneugénica, pode recorrer-se a métodos de análise que utilizam anticorpos anticinetócoros, sondas centroméricas específicas *in situ* ou outros.

Avaliação e interpretação dos resultados

62. No caso de resultados claramente positivos ou negativos, não são exigidos ensaios adicionais de confirmação. Os resultados inconclusivos podem ser clarificados analisando mais 1 000 células, de todas as culturas, para que os ensaios não percam o seu caráter cego. Se, ainda assim, não for possível esclarecer o resultado, será necessário efetuar mais ensaios. Nessa eventualidade, será de ponderar a modificação dos parâmetros do estudo, alargando ou estreitando a gama de condições, conforme se justifique. Os parâmetros do estudo que podem ser alterados incluem o espaçamento das concentrações ensaiadas, a cronologia do tratamento e da colheita de células e/ou as condições da ativação metabólica.

63. Existem vários critérios para determinar se um resultado é positivo, nomeadamente um aumento do número de células com micronúcleos em função da concentração ou com significado estatístico. O primeiro aspeto a ponderar é o significado biológico dos resultados. Ao avaliar se a resposta obtida tem significado em termos biológicos, pode constituir fator de orientação verificar se os valores observados se situam dentro ou fora da gama historicamente abrangida pelos controlos. Para facilitar a avaliação dos resultados dos ensaios, podem utilizar-se métodos estatísticos adequados (65). Todavia, devem avaliar-se resultados estatísticos associados à resposta à dosagem. Também devem ser tidos em conta os dados históricos e de reprodutibilidade.

▼M3

64. Embora a maior parte dos ensaios dê resultados claramente positivos ou negativos, em alguns casos os dados obtidos não permitem tirar conclusões definitivas acerca da atividade da substância em estudo. Essas respostas inconclusivas ou questionáveis podem ocorrer independentemente do número de vezes que o ensaio for repetido.

65. Um resultado positivo num ensaio *in vitro* de micronúcleos indica que a substância em estudo induz cisões ou perdas cromossomáticas em células de mamíferos em cultura. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz cisões, aquisições ou perdas cromossomáticas em células de mamíferos em cultura.

Relatório do ensaio

66. O relatório do ensaio deve incluir, pelo menos, as informações seguintes que sejam pertinentes no estudo realizado:

Produto químico em estudo:

— dados de identificação, número de registo CAS (*Chemical Abstract Service*) e número CE,

— natureza física e grau de pureza,

— propriedades físico-químicas pertinentes para o estudo,

— reatividade do produto com o solvente/excipiente ou com o meio de cultura das células;

Solvente/excipiente:

— justificação da escolha do solvente/excipiente,

— solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/ /excipiente;

Células:

— tipo e origem das células utilizadas,

— adequação do tipo de célula utilizado,

— ausência de micoplasmas, quando aplicável,

— dados relativos à duração do ciclo celular, ao tempo de duplicação e ao índice de proliferação,

— caso sejam utilizados linfócitos, sexo, idade e número dos dadores de sangue, se pertinente,

— caso sejam utilizados linfócitos, utilização de sangue integral ou de linfócitos separados,

— número de repicagens, quando aplicável,

— métodos de manutenção das culturas celulares, quando aplicável,

— número modal de cromossomas,

— duração normal (correspondente ao controlo negativo) do ciclo celular;

Condições de ensaio:

— identificação da substância bloqueante da citocinese eventualmente utilizada (por exemplo, citocalasina B), concentração da mesma e duração da exposição das células,

— justificação da seleção das concentrações e do número de culturas, incluindo, quando disponíveis, dados de citotoxicidade e limitações de solubilidade,

— composição dos meios e, quando aplicável, concentração de CO_2,

— concentrações da substância em estudo,

▼M3

— concentração (e/ou volume) do excipiente e da substância em estudo adicionados,

— tempo e temperatura de incubação,

— duração do tratamento,

— tempo decorrido entre o tratamento e a colheita das células,

— densidade celular da sementeira, quando aplicável,

— tipo e composição do sistema de ativação metabólica; critérios de aceitabilidade,

— produtos químicos de controlo positivo e controlos negativos,

— métodos de preparação das lâminas e técnica de coloração utilizada,

— critérios de identificação dos micronúcleos,

— números de células analisados,

— métodos de medição da citotoxicidade,

— outros dados pertinentes relativos à citotoxicidade,

— critérios definidos para que os resultados do estudo sejam considerados positivos, negativos ou inconclusivos,

— método(s) de análise estatística utilizado(s),

— métodos (como a utilização de anticorpos anticinetócoros) para determinar se os micronúcleos contêm cromossomas inteiros ou fragmentos de cromossomas, quando aplicável;

Resultados:

— métodos de medição da citotoxicidade utilizados, por exemplo, CBPI ou índice de replicação, no caso do recurso ao método do bloqueio da citocinese, ou RICC, RPD ou índice de proliferação, no caso contrário; outras observações, se pertinente (por exemplo, grau de confluência celular, apóptoses, necroses, contagem das células em metáfase, frequência de células binucleadas),

— sinais de precipitação,

— dados de pH e de pressão osmótica do meio de tratamento, caso tenham sido determinados,

— definição das células aceitáveis para análise,

— distribuição das células mono, bi e plurinucleadas, se for utilizado um método de bloqueio da citocinese,

— número de células com micronúcleos, para cada cultura tratada e de controlo, especificando, caso se justifique, se se trata de células binucleadas ou mononucleadas,

— relação concentração-resposta, quando for possível determiná-la,

— dados (concentrações e solventes) do controlo negativo (solvente/excipiente) e do produto químico de controlo positivo,

— dados históricos do controlo negativo (solvente/excipiente) e do produto químico de controlo positivo, indicando intervalos, médias, desvios-padrão e intervalos de confiança (por exemplo, 95 %),

— análise estatística; valores p (probabilidade de significância), caso sejam conhecidos;

Discussão dos resultados;

Conclusões.

▼**M3**

REFERÊNCIAS

(1) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1-4.

(2) Parry, J.M., Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Res.*, 287, 3-15.

(3) Fenech, M., Morley, A.A. (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios.*, 43, 233-246.

(4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W., Wakata, A. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen*., 35, 167-172.

(5) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.

(6) Fenech, M., Morley, A.A. (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Res.*, 161, 193-198.

(7) Eastmond, D.A., Tucker, J.D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.

(8) Eastmond, D.A., Pinkel, D. (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in--situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes. *Mutation Res.*, 234, 9-20.

(9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U., Adler, I.D. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, 6, 297-302.

(10) Farooqi, Z., Darroudi, F., Natarajan, A.T. (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis*, 8, 329-334.

(11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C., Lo Jacono, F. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Res.*, 319, 205-213.

(12) Norppa, H., Renzi, L., Lindholm, C. (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis*, 8, 519-525.

(13) Eastmond, D.A, Rupa, D.S., Hasegawa, L.S. (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Res.*, 322, 9-20.

(14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J., Bentley, K.S. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Res.*, 372, 233-245.

(15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R., Crebelli, R. (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Res.*, 372, 211-219.

(16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W., Wakata, A. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153-163.

▼M3

(17) OCDE (1997). *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test. Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [www.oecd.org/env/testguidelines].

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G., Marzin, D. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Res.*, 607, 13-36.

(19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V., Lorge, E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Res.*, 607, 37-60.

(20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D., Lorge, E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. III. Using CHO cells. *Mutation Res.*, 607, 61-87.

(21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D., Lorge, E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Res.*, 607, 88-124.

(22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D., Lorge, E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. V. Using L5178Y cells. *Mutation Res.*, 607, 125-152.

(23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A., Locher, F. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Res.*, 392, 187-208.

(24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V., Lorge, E. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Res.*, 392, 45-59.

(25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D., Madle, S. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung. *Mutation Res.*, 410, 81-116.

(26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W., Madle, S. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Res.*, 439, 183-190.

(27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P., Müller, L. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Res.*, 445, 55-71.

(28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H., Madle, S. (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Res*., 468, 137-163.

(29) Garriott, M.L., Phelps, J.B., Hoffman, W.P. (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Res.*, 517, 123-134.

(30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K., Sofuni, T. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, 14, 569-580.

▼M3

(31) Elhajouji, A., Lorge, E. (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Res.*, 607, 1-152.

(32) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. 25.ª reunião do ESAC, 16-17 de novembro de 2006. Disponível em: [http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(33) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Disponível em: [http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys, P. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis*, 23, 271-283.

(35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A., Sofuni, T. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Res.*, 347, 105-115.

(36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M., Knasmeuller, S. (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, 17, 257-260.

(37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J., Majer, B.J. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicol.*, 198, 315-328.

(38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J., Aardema, M.J. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Res.*, 392, 61-70.

(39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J., Myhr, B.C. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147-205.

(40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I., Okumura, K. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Res.*, 268, 297-305.

(41) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environ. Mutagen*., 8, 789-886.

(42) Fenech, M., Morley, A.A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.*, 147, 29-36.

(43) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Res.*, 392, 11-18.

(44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A., Zijno, A. (2001). Human MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes. I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutagen*., 37, 31-45.

▼**M3**

(45) Maron, D.M., Ames, B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.

(46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R., Zeiger, E. (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.

(47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M., Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.

(48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K., Sugimura, T. (1976). A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. *In* de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R., Philpot, R.M. (eds.), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. Elsevier, North-Holland, p. 85-88.

(49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R., Galloway, S.M. (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.

(50) PNUA (2001). Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes. Programa das Nações Unidas para o Ambiente (PNUA). Disponível em: [http://www.pops.int/].

(51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M., Parry, J.M. (1996). An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells. *Mutagenesis*, 11, 247-274.

(52) Krahn, D.F., Barsky, F.C., McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. *In* Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, p. 91-103.

(53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P., Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environ. Mutagenesis*, 5, 795-801.

(54) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Res.*, 285, 35-44.

(55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., Hoffman, W.P. (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Res.*, 521, 103-112.

(56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A. (2004). Corrigendum to «Report from the *in vitro* micronucleus assay working group». *Mutation Res.*, 564, 97-100.

(57) Pincu, M., Bass, D., Norman, A. (1984). An improved micronuclear assay in lymphocytes. *Mutation Res.*, 139, 61-65.

(58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S., Kirkland, D. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Res.*, 655, 1-3.

(59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H., Marcos, R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Res.*, 341, 169-184.

(60) Galloway, S. (2000). Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay. *Environ. Molec. Mutagenesis*, 35, 191-201.

▼**M3**

(61) Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Res.*, 120, 241-247.

(62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Langlois, R. G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Res.*, 120, 269-275.

(63) Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr. (1983). An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Res.*, 120, 241-247.

(64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Res.*, 534, 65-75.

(65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L., Lee, C. (2003). *In vitro* micronucleus test. *In* Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, p. 463-467.

(66) Regulamento (CE) n.º 850/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativo a poluentes orgânicos persistentes e que altera a Diretiva 79/117/CEE, JO L 229 de 30.4.2004, p. 5.

▼M3

Apêndice 1

Definições

Aneugénio: Substância ou processo que, por interação com os componentes do ciclo mitótico ou meiótico de divisão celular, origina aneuploidia em células ou organismos.

Aneuploidia: Desvio, num único ou em mais cromossomas, mas não por séries completas de cromossomas (poliploidia), do número diploide (ou haploide) normal de cromossomas.

Apóptose: Morte celular programada, caracterizada por uma série de etapas conducentes à desintegração das células em partículas envolvidas por membranas, que são em seguida eliminadas por fagocitose ou excreção.

Proliferação celular: Aumento do número de células por divisão celular mitótica.

Centrómero: Região do ADN de um cromossoma na qual os dois cromatídeos se juntam e à qual os dois cinetócoros estão ligados lado a lado.

Clastogénio: Substância ou processo causador de aberrações cromossomáticas estruturais em populações celulares ou organismos.

Citocinese: Processo de divisão celular imediatamente após a mitose, conducente à formação de duas células-filhas, cada uma com o seu núcleo.

Índice de proliferação com bloqueio da citocinese (em inglês «CBPI», de «cytokinesis-block proliferation index»): Proporção de células «segunda divisão» na população tratada, relativamente ao controlo não tratado (ver a fórmula no apêndice 2).

Citóstase: Inibição do crescimento celular (ver a fórmula no apêndice 2).

Citotoxicidade: Efeitos nocivos na estrutura ou na função celular que acabam por causar a morte da célula.

Genotóxico: Termo geral que abrange todos os tipos de danos ao ADN ou aos cromossomas, incluindo fratura, rearranjos por adução, mutações, aberrações cromossomáticas e aneuploidia. Nem todos os tipos de efeitos genotóxicos originam mutações ou danos cromossomáticos estáveis.

Célula em interfase: Célula que não está na fase mitótica.

Cinetócoro: Estrutura proteica formada no centrómero de um cromossoma, à qual se ligam as fibras fusiformes durante a divisão celular, permitindo o movimento organizado dos cromossomas-filhos para os pólos das células-filhas.

Micronúcleo: Pequeno núcleo separado dos núcleos principais das células e que se adicionam a estes, formados durante a telófase da mitose ou meiose por fragmentos de cromossoma ou cromossomas inteiros que ficam para trás.

Mitose: Divisão do núcleo celular, habitualmente subdividida em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase.

Índice mitótico: Relação entre o número de células em metáfase e o número total de células observadas numa população celular, que fornece uma indicação do grau de proliferação da população em causa.

Mutagénico: Que produz uma alteração hereditária de sequências de pares de bases do ADN em genes, ou da estrutura dos cromossomas (aberrações cromossomáticas).

▼**M3**

Não disjunção: Falha de separação de cromatídeos emparelhados, que não são adequadamente segregados para as células-filhas em formação, originando células-filhas com número anormal de cromossomas.

Poliploidia: Aberrações cromossomáticas numéricas em células ou organismos, que abrangem uma ou mais séries completas de cromossomas – por oposição à aneuploidia, que abrange um ou mais cromossomas.

Índice de proliferação (IP): Método de medição da citotoxicidade quando não se utiliza citocalasina B (ver a fórmula no apêndice 2).

Aumento relativo da contagem celular (em inglês «RICC», de «relative increase in cell count»): Método de medição da citotoxicidade quando não se utiliza citocalasina B (ver a fórmula no apêndice 2).

Duplicação da população em termos relativos (em inglês «RPD», de «relative population doubling»): Método de medição da citotoxicidade quando não se utiliza citocalasina B (ver a fórmula no apêndice 2).

Índice de replicação (IR): Proporção de ciclos de divisão celular completados numa cultura tratada, relativamente ao controlo não-tratado, durante o período de exposição e de recuperação (ver a fórmula no apêndice 2).

Produto químico em estudo (ou substância química em estudo): Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

▼M3

Apêndice 2

Fórmulas de quantificação da citotoxicidade

1. *Caso se utilize citocalasina B*, a avaliação da citotoxicidade é feita com base no índice de proliferação com citocinese bloqueada (CBPI) ou no índice de replicação (IR) (16) (58). O primeiro indica o número médio de ciclos celulares por célula durante o período de exposição à citocalasina B, podendo ser utilizado para calcular a proliferação celular. O índice de replicação indica a relação entre o número de núcleos nas culturas tratadas e o número de núcleos nas culturas de controlo e pode ser utilizado para calcular a percentagem de citóstase:

$$\text{Percentagem de citóstase} = 100 - 100\{(CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1)\}$$

em que:

T = se refere à cultura tratada com o produto químico em estudo,

C = se refere à cultura com o excipiente, de controlo,

e:

$$CBPI = \frac{\begin{array}{c}((\text{n.º de células mononucleadas}) + \\ (2 \times \text{n.º de células binucleadas}) + (3 \times \text{n.º de células plurinucleadas}))\end{array}}{(\text{nëmero total de células})}$$

Por conseguinte, se o CBPI for igual a 1 (todas as células mononucleadas), a citóstase é de 100 %.

$$\text{Citóstase} = 100 - IR$$

$$RI = \frac{((\text{n.º de células binucleadas}) + (2 \times \text{n.º de células plurinucleadas})) \div (\text{n.º total de células})_T}{((\text{n.º de células binucleadas}) + (2 \times \text{n.º de células plurinucleadas})) \div (\text{n.º total de células})_C} \times 100$$

T = culturas tratadas,

C = culturas de controlo.

2. Por conseguinte, se o IR for de 53 %, em termos numéricos apenas 53 % das células que se dividiram para formar células binucleadas e plurinucleadas na cultura de controlo se dividiram na cultura tratada – o que corresponde a 47 % de citóstase.

3. *Caso não se utilize citocalasina B*, recomenda-se a avaliação da citotoxicidade com base no aumento relativo da contagem celular (RICC) ou na duplicação da população em termos relativos (RPD) (58), pois ambos os parâmetros têm em conta a proporção de células que sofreu divisão na população celular.

$$RICC = \frac{(\text{Aumento do número de células nas culturas tratadas (final – inicial)})}{(\text{Aumento do número de células nas culturas de controlo (final – inicial)})} \times 100$$

$$RPD = \frac{(\text{Número de duplicações de população nas culturas tratadas})}{(\text{Número de duplicações de população nas culturas decontrolo})} \times 100$$

▼M3

em que:

Duplicação da população = [log (n.º de células após tratamento ÷ n.º inicial de células)] ÷ log 2

4. A um RICC ou RPD de 53 % corresponde, pois, uma citotoxicidade/citóstase de 47 %.

5. Com base no índice de proliferação (IP), pode quantificar-se a citotoxicidade por contagem do número de clones constituídos por uma célula (cl1), duas células (cl2), 3 a 4 células (cl4) e 5 a 8 células (cl8):

$$IP = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. O índice de proliferação também tem sido utilizado como parâmetro fiável e efetivo de citotoxicidade para linhagens celulares cultivadas *in situ* sem citocalasina B (25) (26) (27) (28).

▼M3

Apêndice 3

Produtos químicos de referência recomendados para avaliação de desempenhos (1)

Categoria	Produto químico	N.º CAS	N.º CE
1. Clastogénios ativos sem ativação metabólica			
	Arabinósido de citosina	147-94-4	205-705-9
	Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
2. Clastogénios que necessitam de ativação metabólica			
	Benzo[*a*]pireno	50-32-8	200-028-5
	Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
3. Aneugénios			
	Colchicina	64-86-8	200-598-5
	Vimblastina	143-67-9	205-606-0
4. Substâncias negativas			
	Ftalato de bis(2-etil-hexilo)	117-81-7	204-211-0
	Ácido nalidíxico	389-08-2	206-864-7
	Pireno	129-00-0	204-927-3
	Cloreto de sódio	7647-14-5	231-598-3

(1) Os produtos químicos de referência indicados são os produtos químicos que se recomendam. Só podem substituir-se produtos químicos da lista, ou nela incluir outros, se a atividade desses produtos for conhecida, se induzirem a formação de micronúcleos pelos mesmos mecanismos de ação e também se forem comprovadamente adequados aos produtos químicos a ensaiar pelo método de ensaio *in vitro* de micronúcleos. Consoante a finalidade em vista, a justificação pode incluir também um estudo de validação com uma vasta gama de substâncias ou centrado numa gama mais estreita, baseada na classe química da substância ou no mecanismo indutor de danos em estudo.

▼M3

B.50. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA: ENSAIO DE GÂNGLIOS LINFÁTICOS LOCAIS: DA

INTRODUÇÃO

1. As Diretrizes da OCDE para o ensaio de produtos químicos (*OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*) e os métodos de ensaio da UE são revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas em evolução e de considerações de bem-estar animal. O primeiro método de ensaio utilizado para determinar a sensibilização cutânea no rato – o ensaio de gânglios linfáticos locais (método LLNA, «*Local Lymph Node Assay*», *Test Guideline* 429 da OCDE, capítulo B.42 deste anexo) foi revisto (1). Foram publicados em (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) elementos pormenorizados sobre a validação do método LLNA, bem como uma revisão dos trabalhos conexos. No método LLNA utiliza-se iodo radioativo ou timidina radioativa para medir a proliferação de linfócitos, pelo que o recurso a este ensaio está limitado sempre que a aquisição, utilização e eliminação de matérias radioativas seja problemática. O método «LLNA: DA» (desenvolvido pela Daicel Chemical Industries, Ltd.) é uma versão modificada do método LLNA: não utiliza matérias radioativas e permite determinar quantitativamente, por bioluminescência, o teor de trifosfato de adenosina (ATP) como indicador da proliferação de linfócitos. O método foi validado e examinado, tendo sido recomendado por um painel de avaliação internacional constituído por peritos devido à sua utilidade para a identificação de produtos químicos sensibilizantes e não sensibilizantes da pele, com algumas limitações (10) (11) (12) (13). O método foi concebido para avaliar o potencial de sensibilização da pele de animais por produtos químicos (substâncias e misturas). O capítulo B.6 deste anexo e o *Test Guideline* 406 da OCDE recorrem a ensaios em cobaias, nomeadamente o ensaio de maximização na cobaia e o ensaio de Buehler (14). O método LLNA (capítulo B.42 deste anexo, *Test Guideline* 429 da OCDE) e as duas alterações do mesmo que não recorrem a matérias radioativas (LLNA: DA – capítulo B.50 deste anexo, *Test Guideline* 442 A da OCDE – e LLNA: BrdU-ELISA – capítulo B.51 deste anexo, *Test Guideline* 442 B da OCDE) apresentam vantagens em relação aos ensaios na cobaia descritos no capítulo B.6 e no *Test Guideline* 406 da OCDE (14), traduzidas na redução e no aperfeiçoamento do recurso a animais.

2. O método LLNA: DA é similar ao método LLNA. Estuda a fase indutora da sensibilização cutânea e fornece dados quantitativos adequados para a avaliação da resposta à dosagem. Por outro lado, o facto de permitir detetar sensibilizantes cutâneos sem necessidade de utilizar marcadores radioativos do ADN elimina as questões potenciais em matéria de exposição profissional à radioatividade e de eliminação de resíduos. O presente método possibilita a utilização crescente de ratos na deteção de sensibilizantes cutâneos, o que facilita a redução do recurso a cobaias em ensaios de potencial de sensibilização cutânea (método B6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (14).

DEFINIÇÕES

3. As definições utilizadas figuram no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

4. O método LLNA: DA é um método LLNA modificado para a identificação de produtos químicos potencialmente sensibilizantes da pele, com determinadas limitações. Isso não implica, necessariamente, que o método LLNA: DA deva ser sempre utilizado em substituição do método LLNA ou de ensaios em cobaias (método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (14), mas apenas que é equivalente aos segundos e pode ser utilizado em alternativa, gerando normalmente resultados positivos ou negativos que dispensam confirmação (10) (11). Antes de efetuar o estudo, o laboratório deve examinar todas as informações disponíveis sobre a substância em causa, nomeadamente a identificação e a estrutura química, as propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* da substância e dados toxicológicos sobre

▼M3

produtos químicos com estrutura semelhante. Esse exame destina-se a determinar se o método LLNA: DA se adequa à substância em estudo (dada a incompatibilidade de alguns tipos de produtos químicos com o método LLNA: DA – ver o ponto 5), bem como a facilitar a escolha das dosagens.

5. O método LLNA: DA é um método *in vivo*, não eliminando, portanto, a utilização de animais na avaliação da atividade sensibilizante alérgica por contacto. Pode, no entanto, reduzir o recurso a animais para estes fins, quando comparado com os ensaios na cobaia (método B.6 e *Test Guideline* 406 da OCDE) (14). Além disso, proporciona melhorias substanciais (menos dor e sofrimento) no modo como os animais são utilizados nos ensaios de sensibilização alérgica por contacto, uma vez que, ao contrário do método B.6 e do *Test Guideline* 406 da OCDE, não exige a indução de reações de hipersensibilidade dérmica por agentes externos. Apesar das vantagens do método LLNA: DA em relação ao método B.6 e ao *Test Guideline* 406 da OCDE (14), existem limitações que podem exigir o recurso a estes últimos, por exemplo, para ensaiar determinados metais, em virtude dos resultados falsos positivos que se obtêm com certos irritantes cutâneos (como algumas substâncias tensioativas) (6) – 1 e capítulo B.42 do presente anexo – ou devido a problemas de solubilidade da substância em estudo. Por outro lado, no caso das substâncias ou classes de substâncias químicas com grupos funcionais que, comprovadamente, suscitem dúvidas (16), pode ser necessário recorrer a ensaios em cobaias – método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE (14). Relativamente ao método LLNA: DA, foi recomendado que se ponderem também as limitações identificadas para o método LLNA (1 e capítulo B.42 do presente anexo) (10). Acresce que o método LLNA: DA pode não ser adequado para ensaiar substâncias que afetem os níveis de ATP (por exemplo, substâncias inibidoras do ATP) ou que afetem a exatidão da medição do ATP intracelular (por exemplo, presença de enzimas que degradem o ATP ou de ATP extracelular no gânglio linfático). Salvaguardadas estas limitações, o método LLNA: DA é potencialmente aplicável ao ensaio de qualquer substância, a menos que esta possua alguma propriedade passível de comprometer a exatidão do método. Deve ainda ser ponderada a possibilidade de obtenção de resultados positivos próximos do limite caso os valores de índice de estimulação (IE) estejam compreendidos entre 1,8 e 2,5 (ver os pontos 31 e 32). Estas reticências baseiam-se nos dados de validação de 44 substâncias com índice de estimulação igual ou superior a 1,8 (ver o ponto 6), nas quais o método LLNA: DA identificou corretamente todas as 32 substâncias classificadas de sensibilizantes pelo método LLNA, mas identificou incorretamente três das 12 substâncias com índice de estimulação compreendido entre 1,8 e 2,5 (resultado positivo próximo do limite) classificadas de não sensibilizantes pelo método LLNA (10). Todavia, como se utilizou o mesmo conjunto de dados para fixar os valores de índice de estimulação e calcular as propriedades de previsão do ensaio, os resultados referidos podem traduzir uma sobrestimação das reais propriedades de previsão do método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

6. O princípio básico subjacente ao método LLNA: DA é que os sensibilizantes induzem uma proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos drenantes do local de aplicação da substância em estudo. Esta proliferação é proporcional à dosagem e à potência do alergénio aplicado e constitui um modo simples de obter uma medida quantitativa da sensibilização. Mede-se a proliferação e compara-se a proliferação média em cada grupo estudado com a proliferação média no grupo de controlo tratado com o excipiente. Determina-se a razão entre a proliferação média em cada grupo tratado e a proliferação observada em paralelo no grupo de controlo tratado com o excipiente; essa razão é denominada índice de estimulação (IE). Para que uma substância em estudo possa ser classificada

▼M3

de sensibilizante cutânea potencial, este índice deve ser ≥ 1,8. O presente método baseia-se na medição do teor de ATP por bioluminescência (reconhecidamente correlacionado com o número de células vivas) (17) como indicador do aumento do número de células em proliferação nos gânglios linfáticos drenantes do sistema auricular (18) (19). O método de bioluminescência utiliza a enzima luciferase para catalisar a emissão de luz a partir de ATP e luciferina, de acordo com a seguinte reação:

$$ATP + luciferina + O_2 \xrightarrow{Luciferase} oxiluciferina + AMP + PP_i + CO_2 + luz$$

A intensidade da luz emitida é medida com um luminómetro e é diretamente proporcional à concentração de ATP. O ensaio luciferina-luciferase é um método sensível de determinação quantitativa do ATP utilizado numa grande variedade de aplicações (20).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Escolha da espécie animal

7. O rato é a espécie escolhida para este ensaio. Os estudos de validação do método LLNA: DA foram efetuados exclusivamente com a estirpe CBA/J, que é portanto considerada a estirpe preferida (12) (13). Utilizam-se fêmeas adultas jovens, nulíparas e não grávidas. No início do estudo, os animais devem ter entre oito e 12 semanas; a variação de peso dos animais entre si deve ser mínima e não deve exceder 20 % do peso médio dos mesmos. Podem ser utilizadas outras estirpes, bem como machos, quando houver dados suficientes que demonstrem não existirem diferenças significativas na resposta ao método LLNA: DA relacionadas com a estirpe e/ou o sexo do animal.

Condições de alojamento e alimentação

8. Os ratos devem ser alojados em grupo (21), a menos que se justifique cientificamente o seu alojamento individual. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa não deve ser inferior a 30 % e, de preferência, não deve exceder 70 %, exceto durante a limpeza do biotério. Idealmente, deve procurar manter-se entre 50 % e 60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

Preparação dos animais

9. Os animais são selecionados aleatoriamente, marcados de modo a permitir a identificação individual (mas não por marcação nas orelhas) e mantidos em gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes da aplicação das doses, para permitir a aclimatação às condições do laboratório. Antes do início do tratamento, examinam-se os animais, de modo a assegurar que não apresentam lesões cutâneas visíveis.

Preparação das soluções a aplicar

10. Antes da aplicação nas orelhas dos ratos, os produtos químicos sólidos dissolvem-se ou suspendem-se em solventes/excipientes e, se necessário, diluem-se. Os produtos líquidos podem ser aplicados tal e qual ou ser diluídos antes da aplicação. Os produtos químicos insolúveis, como os geralmente presentes nos dispositivos médicos, devem ser sujeitos a um processo de extração exaustivo com um solvente apropriado, a fim de nele concentrar para o ensaio todos os componentes extraíveis, antes da aplicação nas orelhas dos ratos. As substâncias em estudo devem ser preparadas diariamente, a menos que haja dados de estabilidade que demonstrem ser aceitável o seu armazenamento.

▼M3

Verificação da fiabilidade

11. Utilizam-se produtos químicos de controlo positivo para demonstrar o desempenho adequado do ensaio, devendo obter-se uma resposta quantitativamente bem caracterizada, com sensibilidade adequada e reprodutível, a essas substâncias sensibilizantes. Recomenda-se a inclusão, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para demonstrar a competência do laboratório na execução de cada ensaio e possibilitar a avaliação da reprodutibilidade e comparabilidade intra e interlaboratoriais. Algumas autoridades reguladoras exigem também um produto químico de controlo positivo em cada estudo, pelo que os laboratórios devem consultar as autoridades competentes antes de aplicarem o método LLNA: DA. Aconselha-se, portanto, a utilização rotineira, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para evitar a eventual necessidade de ensaios suplementares em animais decorrente do recurso apenas periódico a esses produtos químicos de controlo (ver o ponto 12). No método LLNA: DA, o produto químico de controlo positivo deve induzir uma resposta positiva a um nível de exposição do qual se espere um aumento do índice de estimulação $\geq 1{,}8$ em relação ao grupo de controlo negativo. Deve escolher-se a dosagem do produto químico de controlo positivo de modo que este não cause irritação cutânea excessiva nem toxicidade sistémica e que a indução seja reprodutível, mas não excessiva (considera-se excessivo um índice de estimulação superior a 10). Os produtos químicos de controlo positivo preferidos são aldeído hexilcinâmico (n.º CAS 101-86-0) a 25 % e eugenol (n.º CAS 97-53-0) a 25 % numa mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1. Em certas circunstâncias, e perante justificação adequada, podem utilizar-se outros produtos químicos de controlo positivo que cumpram os critérios atrás referidos.

12. Embora seja recomendada a inclusão, em paralelo, de um grupo de controlo positivo, em algumas situações pode justificar-se que um laboratório que aplique o método LLNA: DA regularmente (isto é, pelo menos uma vez por mês) efetue ensaios de controlo positivo apenas periódicos (a intervalos não superiores a seis meses) e mantenha uma base de dados histórica dos produtos químicos de controlo positivo que comprove a capacidade do laboratório de obter resultados reprodutíveis e exatos com esses produtos. A competência na execução do método LLNA: DA pode demonstrar-se obtendo resultados positivos constantes com um produto químico de controlo positivo em pelo menos 10 ensaios independentes efetuados num período razoável (menos de um ano).

13. Deve incluir-se em paralelo um grupo de controlo positivo sempre que haja alguma alteração processual do método LLNA: DA (por exemplo, alterações do pessoal formado, das matérias e/ou dos reagentes utilizados no método de ensaio, do equipamento utilizado neste último ou da origem dos animais estudados), devendo essas alterações ser documentadas nos relatórios laboratoriais. Deve analisar-se a incidência dessas alterações na adequação da base de dados históricos anteriormente estabelecida, ponderando a necessidade de criar uma nova base de dados históricos para documentar a coerência dos resultados obtidos com os produtos químicos de controlo positivo.

14. Os investigadores devem ter presente que a decisão de efetuar o estudo de produtos químicos de controlo positivo periodicamente, e não em paralelo, tem implicações na adequação e aceitabilidade dos resultados negativos dos estudos efetuados sem produto químico de controlo positivo em paralelo, no intervalo entre cada estudo de controlo positivo periódico. Por exemplo, se for obtido um resultado falso negativo num estudo de controlo positivo periódico, podem questionar-se os resultados negativos eventualmente obtidos para as substâncias em estudo no período compreendido entre o último estudo periódico aceitável de controlo positivo e o estudo periódico inaceitável de controlo positivo. Ao optar entre a inclusão em paralelo de produtos químicos de controlo positivo e um controlo positivo apenas periódico, devem ponderar-se cuidadosamente as consequências. Deve também ponderar-se a utilização de menos animais no grupo de controlo positivo em paralelo, se houver justificação científica para isso e se o laboratório demonstrar, com base em dados históricos próprios, que podem ser utilizados menos ratos (22).

▼M3

15. Embora se deva ensaiar o produto químico de controlo positivo num excipiente que reconhecidamente garanta coerência nas respostas (por exemplo, acetona e azeite na proporção volúmica 4:1), em determinadas situações regulamentares poderá ser também necessário efetuar o ensaio num excipiente não convencional (formulação clínica ou quimicamente pertinente) (23). Se o ensaio em paralelo de um produto químico de controlo positivo for efetuado com um excipiente diverso do da substância em estudo, deve incluir-se um controlo de excipiente para o produto químico de controlo positivo ensaiado em paralelo.

16. Se o estudo consistir na avaliação de substâncias de uma determinada classe química ou gama de respostas, o recurso a substâncias de referência pode ser útil para demonstrar que o método de ensaio funciona corretamente na deteção do potencial de sensibilização cutânea do tipo de substância em causa. Para que seja considerada adequada, uma substância de referência deve possuir as seguintes propriedades:

— semelhança estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo;

— características físico-químicas conhecidas;

— dados corroborantes do método LLNA: DA;

— dados corroborantes de outros modelos animais e/ou de ensaios em pessoas.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Número de animais e níveis de dosagem

17. Utilizam-se, no mínimo, quatro animais por grupo de dosagem e um mínimo de três concentrações da substância em estudo, além de um grupo de controlo negativo em paralelo, tratado apenas com o excipiente da substância em estudo, e de um produto químico de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 15). Deve ponderar-se o ensaio de várias doses do produto químico de controlo positivo, sobretudo quando este for ensaiado com intermitência. Os animais dos grupos de controlo devem ser manuseados e tratados de modo idêntico ao dos animais dos grupos tratados, exceto no que respeita à administração da substância em estudo.

18. A escolha da dosagem e do excipiente deve basear-se nas recomendações das referências (2) e (24). Selecionam-se normalmente as doses consecutivas numa série de concentrações adequada, por exemplo, 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. A seleção das séries de concentração utilizadas deve ter fundamentação científica. Na escolha de três concentrações consecutivas de modo que a concentração mais elevada maximize a exposição, evitando ao mesmo tempo a ocorrência de toxicidade sistémica e irritação cutânea local excessiva, devem ser tidas em conta as informações toxicológicas (por exemplo, referentes a toxicidade aguda e irritação dérmica), bem como estruturais e físico-químicas, disponíveis sobre a substância em estudo (e/ou sobre substâncias estruturalmente afins) (24) (25). Na ausência de tais informações, pode ser necessário um ensaio exploratório prévio (ver os pontos 21 a 24).

19. O excipiente não deve interferir no resultado do ensaio nem distorcê-lo, devendo ser escolhido de modo a maximizar a solubilidade e a obter a maior concentração possível numa solução ou suspensão adequada para aplicação da substância em estudo. Constituem excipientes adequados uma mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1, a *N,N*-dimetilformamida, a metiletilcetona, o propilenoglicol e o sulfóxido dimetílico (6), mas podem utilizar-se outros, desde que com fundamentação científica. Em certas situações, pode ser necessário efetuar um controlo adicional com um solvente utilizado na prática clínica ou a formulação na qual a substância em estudo é comercializada. Deve ter-se especial cuidado em assegurar que as substâncias hidrófilas sejam incorporadas num sistema (excipiente) que molhe a pele e não escorra de imediato, acrescentando solubilizadores adequados (por exemplo, Pluronic® L92 a 1 %). Devem, portanto, evitar-se os excipientes totalmente aquosos.

▼M3

20. A utilização de gânglios linfáticos de ratos distintos possibilita a avaliação da variabilidade de animal para animal e a comparação estatística da diferença entre as medições relativas à substância em estudo e ao grupo de controlo do excipiente (ver o ponto 33). Por outro lado, só pode ponderar-se a redução do número de ratos no grupo de controlo positivo se os dados forem obtidos por animal (22). Além disso, algumas autoridades reguladoras exigem a apresentação de dados por animal. A recolha regular de dados por animal é vantajosa segundo critérios de bem-estar animal, evitando a duplicação de ensaios que seria necessária se os resultados relativos à substância em estudo anteriormente recolhidos de outro modo (por exemplo, agregação de dados relativa a séries de animais) tivessem de ser examinados ulteriormente por autoridades reguladoras com outras exigências (por exemplo, dados individualizados por animal).

Ensaio exploratório prévio

21. Na ausência de informações que permitam determinar a dosagem máxima a ensaiar (ver o ponto 18), é necessário efetuar um ensaio exploratório prévio, a fim de definir a dosagem adequada a ensaiar pelo método LLNA: DA. O objetivo deste ensaio exploratório consiste em fornecer orientações para a escolha da dosagem máxima a utilizar no estudo principal pelo método LLNA: DA, caso não se disponha de informações sobre a concentração que induz toxicidade sistémica (ver o ponto 24) e/ou irritação cutânea local excessiva (ver o ponto 23). A dosagem máxima estudada deve ser uma concentração de 100 % da substância em estudo, no caso dos líquidos, ou a concentração máxima possível, no caso dos sólidos e das suspensões.

22. O ensaio exploratório prévio é efetuado em condições idênticas às do estudo principal pelo método LLNA: DA, mas não se avalia a proliferação nos gânglios linfáticos e podem utilizar-se menos animais por grupo de dosagem. Sugere-se o recurso a um ou dois animais por grupo de dosagem. Observam-se diariamente todos os ratos para verificar se apresentam sinais clínicos de toxicidade sistémica ou de irritação no local de aplicação. Regista-se o peso corporal de cada rato antes do ensaio e antes de o eutanasiar (dia 8). Observam-se as orelhas para verificar se têm eritema e atribui-se-lhes uma pontuação de acordo com o quadro 1 (25). Mede-se a espessura das orelhas com um instrumento adequado – por exemplo, um micrómetro digital ou um leitor de espessuras da Peacock – no dia 1 (antes da primeira dose), no dia 3 (cerca de 48 horas após a primeira dose), no dia 7 (24 horas antes do termo do ensaio) e no dia 8. Complementarmente, no dia 8 pode determinar-se a espessura das orelhas por pesagem de punções auriculares efetuadas depois da eutanásia dos animais. Uma pontuação de eritema ≥ 3 e/ou o aumento da espessura auricular em 25 % ou mais em qualquer dia de medição constituem indicadores de irritação local excessiva (26) (27). Para dosagem mais elevada no estudo principal pelo método LLNA: DA, deve ser escolhida a dosagem da série de concentrações do ensaio exploratório prévio (ver o ponto 18) imediatamente inferior à que induz toxicidade sistémica e/ou irritação cutânea local excessiva.

Quadro 1

Pontuações de eritema

Observação	Pontuação
Ausência de eritema	0
Eritema muito ligeiro (quase impercetível)	1
Eritema bem definido	2

▼M3

Observação	Pontuação
Eritema moderado a intenso	3
Eritema intenso (vermelhidão roxa) ou formação de escara que impede a pontuação do eritema	4

23. Além do referido acerca do aumento de 25 % da espessura auricular (26) (27), também se recorreu a aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular dos ratos tratados, comparativamente aos ratos de controlo, para identificar produtos irritantes pelo método LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Os aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular inferiores a 25 % não foram, porém, especificamente associados a irritação excessiva (30) (31) (32) (33) (34).

24. Quando efetuadas no âmbito de uma avaliação integrada, as seguintes observações clínicas podem indiciar toxicidade sistémica (35), podendo assim indicar a dosagem máxima a utilizar no método LLNA: DA principal: alterações do funcionamento do sistema nervoso (por exemplo, piloereção, ataxia, tremores e convulsões); alterações comportamentais (por exemplo, agressividade, alterações das atividades higiénicas, alterações pronunciadas de atividade); alterações respiratórias (alterações da frequência e da intensidade da respiração, como dispneia, arfar e pieira) e da ingestão de alimentos e de água. Devem ainda ser tidos em conta na avaliação os sinais de letargia e/ou de apatia e quaisquer sinais clínicos de dor ou sofrimento mais do que ligeiros ou momentâneos, ou reduções de peso corporal superiores a 5 % entre o dia 1 e o dia 8, bem como a mortalidade. Os animais moribundos e os animais que manifestem grande sofrimento ou sinais de dor intensa devem ser eutanasiados (36).

Sequência experimental do estudo principal

25. A sequência experimental do ensaio é a seguinte:

— *Dia 1:* Identificar individualmente e anotar o peso de cada animal e todas as observações clínicas. Aplicar no dorso de cada orelha solução aquosa a 1 % de laurilsulfato de sódio, utilizando uma escova molhada nessa solução, de modo a cobrir a totalidade do dorso de cada orelha com quatro ou cinco pinceladas. Uma hora após o tratamento com esta solução de laurilsulfato de sódio, aplicar no dorso de cada orelha 25 µl da diluição adequada da substância em estudo, do excipiente sozinho ou do produto químico de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 15).

— *Dias 2, 3 e 7:* Repetir o pré-tratamento com a solução aquosa a 1 % de laurilsulfato de sódio e o procedimento de aplicação da substância em estudo efetuados no dia 1.

— *Dias 4, 5 e 6:* Nenhum tratamento.

— *Dia 8:* Anotar o peso de cada animal e todas as observações clínicas. Eutanasiar os animais 24 a 30 horas, aproximadamente, após o início da aplicação no dia 7. Excisar os gânglios linfáticos auriculares de drenagem, das orelhas de cada rato, e colocá-los em solução-tampão de fosfato (PBS), separadamente para cada animal. Para pormenores e esquemas da identificação e dissecação dos gânglios linfáticos, ver a referência (22). A fim de melhor avaliar a resposta cutânea local no estudo principal, podem ser incluídos no protocolo de estudo parâmetros suplementares como a pontuação do eritema auricular ou medições da espessura auricular (com um medidor de espessura ou por pesagem de punções auriculares *post mortem*).

▼M3

Preparação das suspensões celulares

26. Preparar suspensões unicelulares de células dos gânglios linfáticos colocando os gânglios excisados bilateralmente de cada rato entre duas lâminas de vidro e aplicando uma pressão ligeira, para os esmagar. Depois de confirmar que os tecidos exsudaram dos gânglios, separar cuidadosamente as duas lâminas. Colocar os tecidos de ambas as lâminas em suspensão em PBS, inclinando cada lâmina por cima de uma placa de Petri e lavando com PBS, enquanto se raspam os tecidos da lâmina com um raspador de células. Os gânglios linfáticos dos animais de controlo negativo são pequenos, pelo que é necessário proceder com cuidado para evitar efeitos artificiais nos valores do índice de estimulação. Deve utilizar-se 1 ml de PBS para lavar as duas lâminas. Utilizando o raspador de células, homogeneizar com cuidado a suspensão de células de gânglios linfáticos na placa de Petri. Com uma micropipeta, colher uma alíquota de 20 μl da suspensão dessas células, tendo o cuidado de não incluir a membrana, visível a olho nu. Misturar com 1,98 ml de PBS, para obter uma amostra de 2 ml. Preparar do mesmo modo uma segunda amostra de 2 ml, de maneira que se obtenham duas amostras por animal.

Determinação da proliferação celular (medição do teor de ATP dos linfócitos)

27. Mede-se o aumento do teor de ATP dos gânglios linfáticos recorrendo ao método da luciferina/luciferase utilizando um conjunto de medição de ATP, que mede a bioluminescência em unidades de luminescência relativa (ULR). O tempo que decorre entre a eutanásia do animal e a medição do teor de ATP que lhe corresponde deve ser uniforme, não devendo exceder cerca de 30 minutos, pois considera-se que o teor de ATP decresce gradualmente após a morte do animal (12). Assim, o processo compreendido entre a excisão dos gânglios linfáticos auriculares e a medição do ATP deve estar concluído ao fim de 20 minutos, seguindo uma cronologia pré-estabelecida idêntica para todos os animais. Mede-se a luminescência de ATP em cada amostra de 2 ml, obtendo-se, portanto, duas medições de ATP por animal. Determina-se então a luminescência média de ATP, cujo valor é subsequentemente utilizado nos cálculos (ver o ponto 30).

OBSERVAÇÕES

Observações clínicas

28. Observar cuidadosamente cada rato pelo menos uma vez por dia, com vista à deteção de sinais clínicos, quer de irritação local no ponto de aplicação, quer de toxicidade sistémica. Anotar todas as observações, mantendo um registo para cada rato. Os planos de controlo devem incluir critérios para identificar prontamente os ratos que evidenciem níveis de toxicidade sistémica, irritação cutânea local excessiva ou corrosão da pele passíveis de justificarem a eutanásia do animal (36).

Pesos corporais

29. Tal como referido no ponto 25, mede-se o peso corporal de cada animal no início do ensaio e quando da eutanásia programada.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

30. Os resultados correspondentes a cada grupo de tratamento exprimem-se em índice de estimulação (EI) médio. Determina-se o índice de estimulação dividindo a média das unidades de luminescência relativa/rato, correspondente a cada grupo tratado com a substância em estudo e ao grupo de controlo positivo, pela média das unidades de luminescência relativa/rato do grupo de controlo do solvente/excipiente. O índice de estimulação médio para o grupo de controlo tratado com o excipiente é igual a 1.

▼M3

31. Para efeitos de decisão, consideram-se positivos os resultados de índice de estimulação ≥ 1,8 (10). Todavia, ao ponderar se um resultado próximo do limite (índice de estimulação compreendido entre 1,8 e 2,5) deve ou não ser considerado positivo, podem ter-se também em conta o grau de resposta à dosagem, a significância estatística e a coerência das respostas correspondentes ao solvente/excipiente e à substância de controlo positivo (2), (3) (37).

32. No caso das respostas positivas próximas do limite, com índice de estimulação compreendido entre 1,8 e 2,5, pode ser útil aos utilizadores terem em conta, juntamente com os valores de índice de estimulação, informações adicionais como a resposta à dosagem, sinais de toxicidade sistémica ou de irritação excessiva e, se for caso disso, a significância estatística, para confirmar se os resultados obtidos são positivos (10). Devem examinar-se também as propriedades da substância em estudo, nomeadamente se esta possui estrutura semelhante a sensibilizantes cutâneos conhecidos ou causa irritação cutânea excessiva nos ratos, bem como a natureza da resposta à dosagem observada. Na referência (4) analisam-se em pormenor estes e outros aspetos.

33. A recolha de dados para cada rato possibilita uma análise estatística da existência, nos dados, de indicações de resposta à dosagem e do grau desta resposta. A avaliação estatística pode incluir uma avaliação da resposta à dosagem e comparações, convenientemente adaptadas, de grupos estudados (por exemplo, comparações par a par de um grupo correspondente a uma determinada dosagem com o grupo de controlo tratado com o solvente/excipiente ensaiado em paralelo). As análises estatísticas podem incluir, por exemplo, regressões lineares ou testes de William, para analisar tendências de resposta à dosagem, e testes de Dunnett, para comparações par a par. Na escolha de um método de análise estatística apropriado, o investigador deve estar atento a possíveis divergências das variâncias e a outros problemas conexos passíveis de exigirem uma transformação dos dados ou uma análise estatística não-paramétrica. O investigador pode ainda ter de efetuar os cálculos de índice de estimulação e as análises estatísticas considerando alguns pontos e descartando outros (por vezes denominados «aberrantes»).

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

34. Os dados devem ser resumidos em quadros, indicando os valores de ULR correspondentes a cada animal, a média de ULR/animal do grupo, o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) e o índice de estimulação médio para cada grupo de dosagem, comparativamente ao grupo de controlo do solvente/excipiente ensaiado em paralelo.

Relatório do ensaio

35. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produtos químicos em estudo e de controlo:

— dados de identificação (por exemplo, números CAS e CE – caso existam –, origem, grau de pureza, impurezas conhecidas, número de lote),

— natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, volatilidade, estabilidade, solubilidade),

— no caso de misturas, composição e percentagens relativas dos componentes;

Solvente/excipiente:

— dados de identificação (grau de pureza, concentração – se adequado –, volume utilizado),

— justificação da escolha do excipiente;

▼M3

Animais utilizados nos ensaios:

— origem dos ratos CBA,

— estado microbiológico dos animais, caso seja conhecido,

— número e idade dos animais,

— origem dos animais, condições de alojamento, dieta, etc.;

Condições de ensaio:

— origem, número de lote e dados de garantia de qualidade/controlo de qualidade do fabricante para o conjunto de medição do ATP,

— elementos sobre a preparação e aplicação da substância em estudo,

— justificação das dosagens escolhidas, incluindo os resultados do ensaio exploratório prévio, caso tenha sido efetuado,

— concentrações do excipiente e da substância em estudo utilizadas e quantidade total desta aplicada,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— elementos sobre a organização cronológica dos tratamentos e da colheita das amostras,

— métodos de medição da toxicidade,

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo ou negativo,

— elementos sobre eventuais desvios ao protocolo e explicação do modo como estes afetam a realização e os resultados do estudo;

Verificação da fiabilidade:

— resumo dos resultados da última verificação de fiabilidade, incluindo informações sobre a substância em estudo, a concentração e o excipiente utilizados,

— dados do laboratório relativos a controlos positivos ensaiados em paralelo e/ou históricos e a controlos negativos (solvente/excipiente) ensaiados em paralelo,

— se não tiver sido efetuado em paralelo um controlo positivo, a data do controlo positivo periódico mais recente e o relatório laboratorial correspondente, bem como um relatório que especifique os dados históricos de controlos positivos do laboratório nos quais se baseou a decisão de não efetuar um controlo positivo paralelo;

Resultados:

— peso de cada rato no início da dosagem e na altura da sua morte programada, bem como a média e o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo), para cada grupo de tratamento,

— surgimento e evolução de sinais de toxicidade, incluindo irritação dérmica no local da aplicação (caso ocorra), para cada animal,

— cronologia da morte e da medição do ATP, para cada animal,

— quadro de valores de ULR e de índices de estimulação para cada grupo de dosagem, por rato,

— média e parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) de ULR/rato, para cada grupo de tratamento, e resultados da análise dos pontos aberrantes, também para cada grupo de tratamento,

▼M3

— índice de estimulação calculado e medida adequada da variabilidade de animal para animal, relativamente à substância em estudo e nos grupos de controlo,

— resposta à dosagem,

— análises estatísticas que se justifiquem;

Análise dos resultados:

— comentário breve sobre os resultados obtidos; análise da resposta à dosagem, análises estatísticas que se justifiquem e conclusão sobre a classificação, ou não, da substância em estudo como sensibilizante cutânea.

REFERÊNCIAS

(1) OCDE (2010). Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) Chamberlain, M., Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I., Loveless, S.E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol*., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999). The murine local lymph node assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 34, 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 249-257.

(10) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/ /methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm].

▼M3

(11) ICCVAM (2009). Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K., Ito, M. (2008). Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I., Yuasa, A. (2008). Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.

(14) OCDE (1992). Skin Sensitisation. Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C., Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896-1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R., Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90-96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J., Fletcher J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81-88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T., Matsumoto, S. (1984). Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127-132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M., Shakesheff, K.M. (2003). Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.

(20) Lundin A. (2000). Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346-370.

(21) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7.ª edição. Washington, DC. National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Science. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.pdf].

(23) McGarry, H.F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71-89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W., Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13-31.

(25) OCDE (2002). Acute Dermal Irritation/Corrosion. Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L., DeGeorge, G.L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009). Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S., Meade, B.J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P., Vohr, V.W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B., Meade, B.J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B., Meade, B.J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R., Vohr, H.W. (2005). A European interlaboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W., Ahr, H.J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E., Germolec, D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(36) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(38) OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (38).

Substância de referência: Substância (sensibilizante ou não) utilizada como termo de comparação com a substância em estudo. Deve ter as seguintes propriedades: i) origem ou origens uniformes e fiáveis; ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo; iii) características físico-químicas conhecidas; iv) disponibilidade de dados sobre os efeitos conhecidos; e v) potência conhecida situada na gama de reação pretendida.

Falso negativo: Substância incorretamente considerada negativa ou inativa pelo método de ensaio, quando na realidade é positiva ou ativa.

Falso positivo: Substância incorretamente considerada positiva ou ativa pelo método de ensaio, quando na realidade é negativa ou inativa.

Perigo: Potencial de efeitos adversos na saúde ou no ambiente, que só se manifestam se o grau de exposição for suficiente.

Reprodutibilidade interlaboratorial: Medida do grau em que laboratórios qualificados diferentes, utilizando o mesmo protocolo para ensaiar a mesma substância em estudo, conseguem obter resultados qualitativa e quantitativamente similares. Determina-se durante os processos de pré-validação e de validação. Indica em que medida um ensaio pode ser transferido com êxito para outro laboratório e também se designa por «reprodutibilidade entre laboratórios» (38).

Reprodutibilidade intralaboratorial: Medida do grau em que pessoal qualificado do mesmo laboratório nele consegue repetir resultados com êxito, em momentos diferentes, utilizando o mesmo protocolo. Também se designa por «reprodutibilidade no laboratório» (38).

Ponto aberrante: Observação que difere marcadamente dos outros valores de uma amostra aleatória de uma população.

Garantia de qualidade: Processo de gestão no âmbito do qual a observância das normas de ensaio, das exigências e dos procedimentos de conservação de registos laboratoriais, bem como a exatidão dos dados transferidos, são avaliadas por pessoas independentes das que efetuam os ensaios.

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (38).

Sensibilização cutânea: Processo imunológico que se manifesta quando um indivíduo sensível é exposto, por via tópica, a um alergénio químico indutor de uma resposta imunológica cutânea passível de gerar sensibilização por contacto.

Índice de estimulação (IE): Valor calculado para quantificar o potencial de sensibilização cutânea das substâncias estudadas; corresponde à razão entre a proliferação nos grupos tratados e a proliferação no grupo de controlo do excipiente ensaiado em paralelo.

Substância em estudo (ou produto químico em estudo): Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

▼M3

B.51. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA: ENSAIO DE GÂNGLIOS LINFÁTICOS LOCAIS: BRDU-ELISA

INTRODUÇÃO

1. As Diretrizes da OCDE para o ensaio de produtos químicos (*OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*) e os métodos de ensaio da UE são revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas em evolução e de considerações de bem-estar animal. O primeiro método de ensaio utilizado para determinar a sensibilização cutânea no rato – o ensaio de gânglios linfáticos locais (método LLNA, «*Local Lymph Node Assay*», *Test Guideline* 429 da OCDE, capítulo B.42 deste anexo) foi revisto (1 e capítulo B.42 deste anexo). Foram publicados em (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) elementos pormenorizados sobre a validação do método LLNA, bem como uma revisão dos trabalhos conexos. No método LLNA utiliza-se iodo radioativo ou timidina radioativa para medir a proliferação de linfócitos, pelo que o recurso a este ensaio está limitado sempre que a aquisição, utilização e eliminação de matérias radioativas for problemática. O método «LLNA: BrdU-ELISA» (ELISA: «*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*») é uma versão modificada do método LLNA: não utiliza matérias radioativas, recorrendo à 5-bromo2-desoxiuridina (BrdU) não-radioativa (n.º CAS 59-14-3) num sistema de ensaio ELISA para medir a proliferação de linfócitos. O método foi validado e examinado, tendo sido recomendado por um painel de avaliação científica internacional constituído por peritos independentes devido à sua utilidade para a identificação de produtos químicos sensibilizantes e não sensibilizantes da pele, com algumas limitações (10) (11) (12). O método foi concebido para avaliar o potencial de sensibilização da pele de animais por produtos químicos (substâncias e misturas). O capítulo B.6 deste anexo e o *Test Guideline* 406 da OCDE recorrem a ensaios em cobaias, nomeadamente o ensaio de maximização na cobaia e o ensaio de Buehler (13). O método LLNA (capítulo B.42 deste anexo, *Test Guideline* 429 da OCDE) e as duas alterações do mesmo que não recorrem a matérias radioativas (LLNA: BrdU-ELISA – capítulo B.51 deste anexo, *Test Guideline* 442 B da OCDE – e LLNA: DA – capítulo B.50 deste anexo, *Test Guideline* 442 A da OCDE) apresentam vantagens em relação aos ensaios na cobaia descritos no capítulo B.6 e no *Test Guideline* 406 da OCDE (13), traduzidas na redução e no aperfeiçoamento do recurso a animais.

2. O método LLNA: BrdU-ELISA é similar ao método LLNA. Estuda a fase indutora da sensibilização cutânea e fornece dados quantitativos adequados para a avaliação da resposta à dosagem. Por outro lado, o facto de permitir detetar sensibilizantes cutâneos sem necessidade de utilizar marcadores radioativos do ADN elimina as questões potenciais em matéria de exposição profissional à radioatividade e de eliminação de resíduos. O presente método possibilita a utilização crescente de ratos na deteção de sensibilizantes cutâneos, o que facilita a redução do recurso a cobaias em ensaios de potencial de sensibilização cutânea (capítulo B6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (13).

DEFINIÇÕES

3. As definições utilizadas figuram no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

4. O método LLNA: BrdU-ELISA é um método LLNA modificado para a identificação de produtos químicos potencialmente sensibilizantes da pele, com determinadas limitações. Isso não implica, necessariamente, que o método LLNA: BrdU-ELISA deva ser sempre utilizado em substituição do método LLNA ou de ensaios em cobaias (método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (13), mas apenas que é equivalente aos segundos e pode ser utilizado em alternativa, gerando normalmente resultados positivos ou negativos que dispensam confirmação (10) (11). Antes de efetuar o estudo, o laboratório deve examinar todas as informações disponíveis sobre a substância em causa, nomeadamente a identificação e a estrutura química,

▼M3

as propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros ensaios *in vitro* ou *in vivo* de toxicidade da substância e dados toxicológicos sobre produtos químicos com estrutura semelhante. Esse exame destina-se a determinar se o método LLNA: BrdU-ELISA se adequa à substância em estudo (dada a incompatibilidade de alguns tipos de produtos químicos com o método LLNA: BrdU-ELISA – ver o ponto 5), bem como a facilitar a escolha das dosagens.

5. O método LLNA: BrdU-ELISA é um método *in vivo*, não eliminando, portanto, a utilização de animais na avaliação da atividade sensibilizante alérgica por contacto. Pode, no entanto, reduzir o recurso a animais para estes fins, quando comparado com os ensaios na cobaia (método B.6 e *Test Guideline* 406 da OCDE) (13). Além disso, proporciona melhorias substanciais no modo como os animais são utilizados nos ensaios de sensibilização alérgica por contacto, uma vez que, ao contrário do método B.6 e do *Test Guideline* 406 da OCDE, não exige a indução de reações de hipersensibilidade dérmica por agentes externos. Também não implica a utilização de nenhum adjuvante, ao contrário do que sucede no ensaio de maximização na cobaia (capítulo B.6 do presente anexo, 13), reduzindo a dor e o sofrimento causados aos animais. Apesar das vantagens do método LLNA: BrdU-ELISA em relação ao método B.6 e ao *Test Guideline* 406 da OCDE (13), existem limitações que podem exigir o recurso a estes últimos, por exemplo, para ensaiar certos metais, em virtude dos resultados falsos positivos que se obtêm com certos irritantes cutâneos (como algumas substâncias tensioativas) (6) – 1 e capítulo B.42 do presente anexo – ou devido a problemas de solubilidade da substância em estudo. Por outro lado, no caso das substâncias ou classes de substâncias químicas com grupos funcionais que, comprovadamente, suscitem dúvidas (15), pode ser necessário recorrer a ensaios em cobaias – método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE (13). Relativamente ao método LLNA: BrdU-ELISA, foi recomendado que se ponderam também as limitações identificadas para o método LLNA (1 e capítulo B.42 do presente anexo) (10). Salvaguardadas estas limitações, o método LLNA: BrdU-ELISA é potencialmente aplicável ao ensaio de qualquer produto químico, a menos que este possua alguma propriedade passível de comprometer a exatidão do método. Deve ainda ser ponderada a possibilidade de obtenção de resultados positivos próximos do limite caso os valores de índice de estimulação (IE) estejam compreendidos entre 1,6 e 1,9 (ver os pontos 31 e 32). Estas reticências baseiam-se nos dados de validação de 43 substâncias com índice de estimulação igual ou superior a 1,6 (ver o ponto 6), nas quais o método LLNA: BrdU-ELISA identificou corretamente todas as 32 substâncias classificadas de sensibilizantes pelo método LLNA, mas identificou incorretamente duas das 11 substâncias com índice de estimulação compreendido entre 1,6 e 1,9 (resultado positivo próximo do limite) classificadas de não-sensibilizantes pelo método LLNA (10). Todavia, como se utilizou o mesmo conjunto de dados para fixar os valores de índice de estimulação e calcular as propriedades de previsão do ensaio, os resultados referidos podem traduzir uma sobrestimação das reais propriedades de previsão do método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

6. O princípio básico subjacente ao método LLNA: BrdU-ELISA é que os sensibilizantes induzem uma proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos drenantes do local de aplicação da substância em estudo. Esta proliferação é proporcional à dosagem e à potência do alergénio aplicado e constitui um modo simples de obter uma medida quantitativa da sensibilização. Mede-se a proliferação e compara-se a proliferação média em cada grupo estudado com a proliferação média no grupo de controlo tratado com o excipiente. Determina-se a razão entre a proliferação média em cada grupo tratado e a proliferação observada em paralelo no grupo de controlo tratado com o excipiente; esta razão é denominada índice de estimulação (IE). Para que uma substância em estudo possa ser classificada de sensibilizante cutânea potencial, este índice deve ser $\geq 1{,}6$. O presente método baseia-se na medição do teor de bromodesoxiuridina como indicador do aumento do número de células em proliferação nos gânglios

▼M3

linfáticos drenantes do sistema auricular. A bromodesoxiuridina é um composto análogo da timidina e é similar o modo como se processa a sua incorporação no ADN das células em proliferação. Mede-se a incorporação da bromodesoxiuridina pelo método ELISA, que utiliza um anticorpo específico daquela também marcado com peroxidase. Ao adicionar-se o substrato, a peroxidase reage com este produzindo um produto corado, que é determinado quantitativamente, a uma absorvância específica, por meio de um leitor de placas de microtitulação.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Escolha da espécie animal

7. O rato é a espécie escolhida para este ensaio. Os estudos de validação do método LLNA: BrdU-ELISA foram efetuados exclusivamente com a estirpe CBA/JN, que é portanto considerada a estirpe preferida (10) (12). Utilizam-se fêmeas adultas jovens, nulíparas e não grávidas. No início do estudo, os animais devem ter entre oito e 12 semanas; a variação de peso dos animais entre si deve ser mínima e não deve exceder 20 % do peso médio dos mesmos. Podem ser utilizadas outras estirpes, bem como machos, quando houver dados suficientes que demonstrem não existirem diferenças significativas na resposta ao método LLNA: BrdU-ELISA relacionadas com a estirpe e/ou o sexo do animal.

Condições de alojamento e alimentação

8. Os ratos devem ser alojados em grupo (16), a menos que se justifique cientificamente o seu alojamento individual. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa não deve ser inferior a 30 % e, de preferência, não deve exceder 70 %, exceto durante a limpeza do biotério. Idealmente, deve procurar manter-se entre 50 % e 60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

Preparação dos animais

9. Os animais são selecionados aleatoriamente, marcados de modo a permitir a identificação individual (mas não por marcação nas orelhas) e mantidos em gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes da aplicação das doses, para permitir a aclimatação às condições do laboratório. Antes do início do tratamento, examinam-se os animais, de modo a assegurar que não apresentam lesões cutâneas visíveis.

Preparação das soluções a aplicar

10. Antes da aplicação nas orelhas dos ratos, os produtos químicos sólidos dissolvem-se ou suspendem-se em solventes/excipientes e, se necessário, diluem-se. Os produtos líquidos podem ser aplicados tal e qual ou ser diluídos antes da aplicação. Os produtos químicos insolúveis, como os geralmente presentes nos dispositivos médicos, devem ser sujeitos a um processo de extração exaustivo com um solvente apropriado, a fim de nele concentrar para o ensaio todos os componentes extraíveis, antes da aplicação nas orelhas dos ratos. As substâncias em estudo devem ser preparadas diariamente, a menos que haja dados de estabilidade que demonstrem ser aceitável o seu armazenamento.

Verificação da fiabilidade

11. Utilizam-se produtos químicos de controlo positivo para demonstrar o desempenho adequado do ensaio, devendo obter-se uma resposta quantitativamente bem caracterizada, com sensibilidade adequada e reprodutível, a essas substâncias sensibilizantes. Recomenda-se a inclusão, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para demonstrar a competência do laboratório na execução de cada ensaio e possibilitar a avaliação da reprodutibilidade e comparabilidade intra e interlaboratoriais. Algumas autoridades reguladoras exigem também um produto químico de controlo

▼M3

positivo em cada estudo, pelo que os laboratórios devem consultar as autoridades competentes antes de aplicarem o método LLNA: BrdU-ELISA. Aconselha-se, portanto, a utilização rotineira, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para evitar a eventual necessidade de ensaios suplementares em animais decorrente do recurso apenas periódico a esses produtos químicos de controlo (ver o ponto 12). No método LLNA: BrdU-ELISA, o produto químico de controlo positivo deve induzir uma resposta positiva a um nível de exposição do qual se espere um aumento do índice de estimulação ≥ 1,6 em relação ao grupo de controlo negativo. Deve escolher-se a dosagem do produto químico de controlo positivo de modo que este não cause irritação cutânea excessiva nem toxicidade sistémica e que a indução seja reprodutível, mas não excessiva (considera-se excessivo um índice de estimulação superior a 14). Os produtos químicos de controlo positivo preferidos são aldeído hexilcinâmico (n.º CAS 101-86-0) a 25 % e eugenol (n.º CAS 97-53-0) a 25 % numa mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1. Em certas circunstâncias, e perante justificação adequada, podem utilizar-se outros produtos químicos de controlo positivo que cumpram os critérios atrás referidos.

12. Embora seja recomendada a inclusão, em paralelo, de um grupo de controlo positivo, em algumas situações pode justificar-se que um laboratório que aplique o método LLNA: BrdU-ELISA regularmente (isto é, pelo menos uma vez por mês) efetue ensaios de controlo positivo apenas periódicos (a intervalos não superiores a seis meses) e mantenha uma base de dados histórica dos produtos químicos de controlo positivo que comprove a capacidade do laboratório de obter resultados reprodutíveis e exatos com esses produtos. A competência na execução do método LLNA: BrdU-ELISA pode demonstrar-se obtendo resultados positivos constantes com um produto químico de controlo positivo em pelo menos 10 ensaios independentes efetuados num período razoável (menos de um ano).

13. Deve incluir-se em paralelo um grupo de controlo positivo sempre que haja alguma alteração processual do método LLNA: BrdU-ELISA (por exemplo, alterações do pessoal formado, das matérias e/ou dos reagentes utilizados no método de ensaio, do equipamento utilizado neste último ou da origem dos animais estudados), devendo essas alterações ser documentadas nos relatórios laboratoriais. Deve analisar-se a incidência dessas alterações na adequação da base de dados históricos anteriormente estabelecida, ponderando a necessidade de criar uma nova base de dados históricos para documentar a coerência dos resultados obtidos com os produtos químicos de controlo positivo.

14. Os investigadores devem ter presente que a decisão de efetuar o estudo de produtos químicos de controlo positivo periodicamente, e não em paralelo, tem implicações na adequação e aceitabilidade dos resultados negativos dos estudos efetuados sem produto químico de controlo positivo em paralelo, no intervalo entre cada estudo de controlo positivo periódico. Por exemplo, se for obtido um resultado falso negativo num estudo de controlo positivo periódico, podem questionar-se os resultados negativos eventualmente obtidos para as substâncias em estudo no período compreendido entre o último estudo periódico aceitável de controlo positivo e o estudo periódico inaceitável de controlo positivo. Ao optar entre a inclusão em paralelo de produtos químicos de controlo positivo e um controlo positivo apenas periódico, devem ponderar-se cuidadosamente as consequências. Deve também ponderar-se a utilização de menos animais no grupo de controlo positivo em paralelo, se houver justificação científica para isso e se o laboratório demonstrar, com base em dados históricos próprios, que podem ser utilizados menos ratos (17).

15. Embora se deva ensaiar o produto químico de controlo positivo num excipiente que reconhecidamente garanta coerência nas respostas (por exemplo, uma mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1), em determinadas situações regulamentares poderá ser também necessário efetuar o ensaio num excipiente não convencional (formulação clínica ou quimicamente pertinente) (18). Se o ensaio em paralelo de um produto químico de controlo positivo for efetuado com um excipiente diverso do da substância em estudo, deve incluir-se um controlo de excipiente para o produto químico de controlo positivo ensaiado em paralelo.

▼M3

16. Se o estudo consistir na avaliação de substâncias de uma determinada classe química ou gama de respostas, o recurso a substâncias de referência pode ser útil para demonstrar que o método de ensaio funciona corretamente na deteção do potencial de sensibilização cutânea do tipo de substância em causa. Para que seja considerada adequada, uma substância de referência deve possuir as seguintes propriedades:

— semelhança estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo;

— características físico-químicas conhecidas;

— dados corroborantes do método LLNA: BrdU-ELISA;

— dados corroborantes de outros modelos animais e/ou de ensaios em pessoas.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Número de animais e níveis de dosagem

17. Utilizam-se, no mínimo, quatro animais por grupo de dosagem e um mínimo de três concentrações da substância em estudo, além de um grupo de controlo negativo em paralelo, tratado apenas com o excipiente da substância em estudo, e de um grupo de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 15). Deve ponderar-se o ensaio de várias doses do produto químico de controlo positivo, sobretudo quando este for ensaiado com intermitência. Os animais dos grupos de controlo devem ser manuseados e tratados de modo idêntico ao dos animais dos grupos tratados, exceto no que respeita à administração da substância em estudo.

18. A escolha da dosagem e do excipiente deve basear-se nas recomendações das referências (2) e (19). Selecionam-se normalmente as doses consecutivas numa série de concentrações adequada, por exemplo, 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. A seleção das séries de concentração utilizadas deve ter fundamentação científica. Na escolha de três concentrações consecutivas de modo que a concentração mais elevada maximize a exposição, evitando ao mesmo tempo a ocorrência de toxicidade sistémica e irritação cutânea local excessiva, devem ser tidas em conta as informações toxicológicas (por exemplo, referentes a toxicidade aguda e irritação dérmica), bem como estruturais e físico-químicas, disponíveis sobre a substância em estudo (e/ou sobre substâncias estruturalmente afins) (19) (referência 20 e capítulo B.4 do presente anexo). Na ausência de tais informações, pode ser necessário um ensaio exploratório prévio (ver os pontos 21 a 24).

19. O excipiente não deve interferir no resultado do ensaio nem distorcê-lo, devendo ser escolhido de modo a maximizar a solubilidade e a obter a maior concentração possível numa solução ou suspensão adequada para aplicação da substância em estudo. Constituem excipientes adequados uma mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1, a *N,N*-dimetilformamida, a metiletilcetona, o propilenoglicol e o sulfóxido dimetílico (6), mas podem utilizar-se outros, desde que com fundamentação científica. Em certas situações, pode ser necessário efetuar um controlo adicional com um solvente utilizado na prática clínica ou a formulação na qual a substância em estudo é comercializada. Deve ter-se especial cuidado em assegurar que as substâncias hidrófilas sejam incorporadas num sistema (excipiente) que molhe a pele e não escorra de imediato, acrescentando solubilizadores adequados (por exemplo, Pluronic® L92 a 1 %). Devem, portanto, evitar-se os excipientes totalmente aquosos.

▼M3

20. A utilização de gânglios linfáticos de ratos distintos possibilita a avaliação da variabilidade de animal para animal e a comparação estatística da diferença entre as medições relativas à substância em estudo e ao grupo de controlo do excipiente (ver o ponto 33). Por outro lado, só pode ponderar-se a redução do número de ratos no grupo de controlo positivo se forem obtidos dados por animal (17). Além disso, algumas autoridades reguladoras exigem a apresentação de dados por animal. A recolha regular de dados por animal é vantajosa segundo critérios de bem-estar animal, evitando a duplicação de ensaios que seria necessária se os resultados relativos à substância em estudo anteriormente recolhidos de outro modo (por exemplo, agregação de dados relativa a séries de animais) tivessem de ser examinados ulteriormente por autoridades reguladoras com outras exigências (por exemplo, dados individualizados por animal).

Ensaio exploratório prévio

21. Na ausência de informações que permitam determinar a dosagem máxima a ensaiar (ver o ponto 18), é necessário efetuar um ensaio exploratório prévio, a fim de definir a dosagem adequada a ensaiar pelo método LLNA: BrdU-ELISA. O objetivo deste ensaio exploratório consiste em fornecer orientações para a escolha da dosagem máxima a utilizar no estudo principal pelo método LLNA: BrdU-ELISA, caso não se disponha de informações sobre a concentração que induz toxicidade sistémica (ver o ponto 24) e/ou irritação cutânea local excessiva (ver o ponto 23). A dosagem máxima estudada deve ser uma concentração de 100 % da substância em estudo, no caso dos líquidos, ou a concentração máxima possível, no caso dos sólidos e das suspensões.

22. O ensaio exploratório prévio é efetuado em condições idênticas às do estudo principal pelo método LLNA: BrdU-ELISA, mas não se avalia a proliferação nos gânglios linfáticos e podem utilizar-se menos animais por grupo de dosagem. Sugere-se o recurso a um ou dois animais por grupo de dosagem. Observam-se diariamente todos os ratos para verificar se apresentam sinais clínicos de toxicidade sistémica ou de irritação no local de aplicação. Regista-se o peso corporal de cada rato antes do ensaio e antes de o eutanasiar (dia 6). Observam-se as orelhas para verificar se têm eritema e atribui-se-lhes uma pontuação de acordo com o quadro 1 (20 e capítulo B.4 do presente anexo). Mede-se a espessura das orelhas com um instrumento adequado – por exemplo, um micrómetro digital ou um leitor de espessuras da Peacock – no dia 1 (antes da primeira dose), no dia 3 (cerca de 48 horas após a primeira dose) e no dia 6. Complementarmente, no dia 6 pode determinar-se a espessura das orelhas por pesagem de punções auriculares efetuadas depois da eutanásia dos animais. Uma pontuação de eritema ≥ 3 e/ou o aumento da espessura auricular em 25 % ou mais em qualquer dia de medição constituem indicadores de irritação local excessiva (21) (22). Para dosagem mais elevada no estudo principal pelo método LLNA: BrdU-ELISA, deve ser escolhida a dosagem da série de concentrações do ensaio exploratório prévio (ver o ponto 18) imediatamente inferior à que induz toxicidade sistémica e/ou irritação cutânea local excessiva.

Quadro 1

Pontuações de eritema

Observação	Pontuação
Ausência de eritema	0
Eritema muito ligeiro (quase impercetível)	1
Eritema bem definido	2

▼M3

Observação	Pontuação
Eritema moderado a intenso	3
Eritema intensa (vermelhidão roxa) ou formação de escara que impede a pontuação do eritema	4

23. Além do referido acerca do aumento de 25 % da espessura auricular (21) (22), também se recorreu a aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular dos ratos tratados, comparativamente aos ratos de controlo, para identificar produtos irritantes pelo método LLNA (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Os aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular inferiores a 25 % não foram, porém, especificamente associados a irritação excessiva (25) (26) (27) (28) (29).

24. Quando efetuadas no âmbito de uma avaliação integrada, as seguintes observações clínicas podem indiciar toxicidade sistémica (30), podendo assim indicar a dosagem máxima a utilizar no método LLNA: BrdU-ELISA principal: alterações do funcionamento do sistema nervoso (por exemplo, piloereção, ataxia, tremores e convulsões); alterações comportamentais (por exemplo, agressividade, alterações das atividades higiénicas, alterações pronunciadas de atividade); alterações respiratórias (alterações da frequência e da intensidade da respiração, como dispneia, arfar e pieira) e da ingestão de alimentos e de água. Devem ainda ser tidos em conta na avaliação os sinais de letargia e/ou de apatia e quaisquer sinais clínicos de dor ou sofrimento mais do que ligeiros ou momentâneos ou reduções de peso corporal superiores a 5 % entre o dia 1 e o dia 6, bem como a mortalidade. Os animais moribundos e os animais que manifestem grande sofrimento ou sinais de dor intensa devem ser eutanasiados (31).

Sequência experimental do estudo principal

25. A sequência experimental do ensaio é a seguinte:

— *Dia 1:* Identificar individualmente e anotar o peso de cada animal e todas as observações clínicas. Aplicar no dorso de cada orelha 25 µl da diluição adequada da substância em estudo, do excipiente sozinho ou do produto químico de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 15).

— *Dias 2 e 3:* Repetir o procedimento de aplicação efetuado no dia 1.

— *Dia 4:* Nenhum tratamento.

— *Dia 5:* Injetar intraperitonealmente 0,5 ml (5 mg/rato) de solução de bromodesoxiuridina (10 mg/ml).

— *Dia 6:* Anotar o peso de cada animal e todas as observações clínicas. Eutanasiar os animais 24 horas, aproximadamente, após a injeção de bromodesoxiuridina. Excisar os gânglios linfáticos auriculares de drenagem, das orelhas de cada rato, e colocá-los em solução-tampão de fosfato (PBS), separadamente para cada animal. Para pormenores e esquemas da identificação e dissecação dos gânglios linfáticos, ver a referência (17). A fim de melhor avaliar a resposta cutânea local no estudo principal, podem ser incluídos no protocolo de estudo parâmetros suplementares como a pontuação do eritema auricular ou medições da espessura auricular (com um medidor de espessura ou por pesagem de punções auriculares *post mortem*).

▼M3

Preparação das suspensões celulares

26. Preparar suspensões unicelulares de células dos gânglios linfáticos de cada rato, excisados bilateralmente, por desagregação mecânica suave através de um peneiro de aço inoxidável com malha de 200 μm ou recorrendo a outra técnica aceitável para obtenção de suspensões unicelulares (por exemplo, utilizando um almofariz de plástico descartável para esmagar os gânglios linfáticos, seguindo-se a passagem através de um peneiro de *nylon* com malha de 70 μm). O processo de preparação da suspensão de células de gânglios linfáticos é um aspeto crítico deste ensaio, pelo que os operadores devem adestrar-se previamente. Os gânglios linfáticos dos animais de controlo negativo são pequenos, pelo que é necessário proceder com cuidado para evitar efeitos artificiais nos valores do índice de estimulação. O volume da suspensão de células de gânglios linfáticos deve ser o volume ótimo determinado para cada caso (aproximadamente 15 ml). O volume ótimo é o que permite obter uma absorvância média do grupo de controlo negativo compreendida entre 0,1 e 0,2.

Determinação da proliferação celular (medição do teor de bromodesoxiuridina do ADN dos linfócitos)

27. Determina-se o teor de bromodesoxiuridina pelo método ELISA com um conjunto comercial (por exemplo, o n.º de catálogo 11 647 229 001 da Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). Adicionar rapidamente, em triplicado, 100 μl da suspensão de células de gânglios linfáticos a uma placa de microtitulação com alvéolos de fundo plano. Depois da fixação e da desnaturação das células, adicionar anticorpos anti-BrdU a cada alvéolo e deixar reagir. A seguir, remover por lavagem os anticorpos anti-BrdU e adicionar a solução do substrato, deixando formar-se o cromogénio. Medir a absorvância a 370 nm, utilizando como referência o comprimento de onda de 492 nm. As condições experimentais do ensaio devem ser sempre otimizadas (ver o ponto 26).

OBSERVAÇÕES

Observações clínicas

28. Observar cuidadosamente cada rato pelo menos uma vez por dia, com vista à deteção de sinais clínicos, quer de irritação local no ponto de aplicação, quer de toxicidade sistémica. Anotar todas as observações, mantendo um registo para cada rato. Os planos de controlo devem incluir critérios para identificar prontamente os ratos que evidenciem níveis de toxicidade sistémica, irritação cutânea local excessiva ou corrosão da pele passíveis de justificarem a eutanásia do animal (31)

Pesos corporais

29. Tal como referido no ponto 25, mede-se o peso corporal de cada animal no início do ensaio e quando da eutanásia programada.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

30. Os resultados correspondentes a cada grupo de tratamento exprimem-se em índice de estimulação (IE) médio. Determina-se o índice de estimulação dividindo o valor médio do índice de marcação com bromodesoxiuridina/ /rato, correspondente a cada grupo tratado com a substância em estudo e ao grupo de controlo positivo, pelo valor médio do índice de marcação com bromodesoxiuridina do grupo de controlo do solvente/excipiente. O índice de estimulação médio para o grupo de controlo tratado com o excipiente é igual a 1.

O índice de marcação com bromodesoxiuridina é definido do seguinte modo:

$$\text{Índice de marcação com bromodesoxiuridina} = (ABS_{em} - ABS\ branco_{em}) - (ABS_{ref} - ABS\ branco_{ref})$$

em que: em = comprimento de onda emitido; ref = comprimento de onda de referência.

▼M3

31. Para efeitos de decisão, consideram-se positivos os resultados de índice de estimulação ≥ 1,6 (10). Todavia, ao ponderar se um resultado próximo do limite (índice de estimulação compreendido entre 1,6 e 1,9) deve ou não ser considerado positivo, podem ter-se também em conta o grau de resposta à dosagem, a significância estatística e a coerência das respostas correspondentes ao solvente/excipiente e à substância de controlo positivo (3) (6) (32).

32. No caso das respostas positivas próximas do limite, com índice de estimulação compreendido entre 1,6 e 1,9, pode ser útil aos utilizadores terem em conta, juntamente com os valores de índice de estimulação, informações adicionais como a resposta à dosagem, sinais de toxicidade sistémica ou de irritação excessiva e, se for caso disso, a significância estatística, para confirmar se os resultados obtidos são positivos (10). Devem examinar-se também as propriedades da substância em estudo, nomeadamente se esta possui estrutura semelhante a sensibilizantes cutâneos conhecidos ou causa irritação cutânea excessiva nos ratos, bem como a natureza da resposta à dosagem observada. Na referência (4) analisam-se em pormenor estes e outros aspetos.

33. A recolha de dados para cada rato possibilita uma análise estatística da existência, nos dados, de indicações de resposta à dosagem e do grau desta resposta. A avaliação estatística pode incluir uma avaliação da resposta à dosagem e comparações, convenientemente adaptadas, de grupos estudados (por exemplo, comparações par a par de um grupo correspondente a uma determinada dosagem com o grupo de controlo tratado com o solvente/excipiente ensaiado em paralelo). As análises estatísticas podem incluir, por exemplo, regressões lineares ou testes de William, para analisar tendências de resposta à dosagem, e testes de Dunnett, para comparações par a par. Na escolha de um método de análise estatística apropriado, o investigador deve estar atento a possíveis divergências das variâncias e a outros problemas conexos passíveis de exigirem uma transformação dos dados ou uma análise estatística não paramétrica. O investigador pode ainda ter de efetuar os cálculos de índice de estimulação e as análises estatísticas considerando alguns pontos e descartar outros (por vezes denominados «aberrantes»).

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

34. Os dados devem ser resumidos em quadros, indicando os valores de índice de marcação com bromodesoxiuridina correspondentes a cada animal, a média do índice de marcação com bromodesoxiuridina/animal do grupo, o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) e o índice de estimulação médio para cada grupo de dosagem, comparativamente ao grupo de controlo do solvente/excipiente ensaiado em paralelo.

Relatório do ensaio

35. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produtos químicos em estudo e de controlo:

— dados de identificação (por exemplo, números CAS e CE – caso existam –, origem, grau de pureza, impurezas conhecidas, número de lote),

— natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, volatilidade, estabilidade, solubilidade),

— no caso de misturas, composição e percentagens relativas dos componentes;

Solvente/excipiente:

— dados de identificação (grau de pureza, concentração – se adequado –, volume utilizado),

— justificação da escolha do excipiente;

▼M3

Animais utilizados nos ensaios:

— origem dos ratos CBA,

— estado microbiológico dos animais, caso seja conhecido,

— número e idade dos animais,

— origem dos animais, condições de alojamento, dieta, etc.;

Condições de ensaio:

— origem, número de lote e dados de garantia de qualidade/controlo de qualidade do fabricante (sensibilidade e especificidade dos anticorpos e limite de deteção) para o conjunto ELISA,

— elementos sobre a preparação e aplicação da substância em estudo,

— justificação das dosagens escolhidas, incluindo os resultados do ensaio exploratório prévio, caso tenha sido efetuado,

— concentrações do excipiente e da substância em estudo utilizadas e quantidade total desta aplicada,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— elementos sobre a organização cronológica dos tratamentos e da colheita das amostras,

— métodos de medição da toxicidade,

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo ou negativo,

— elementos sobre eventuais desvios ao protocolo e explicação do modo como estes afetam a realização e os resultados do estudo;

Verificação da fiabilidade:

— resumo dos resultados da última verificação de fiabilidade, incluindo informações sobre a substância em estudo, a concentração e o excipiente utilizados,

— dados do laboratório relativos a controlos positivos ensaiados em paralelo e/ou históricos e a controlos negativos (solvente/excipiente) ensaiados em paralelo,

— se não tiver sido efetuado em paralelo um controlo positivo, a data do controlo positivo periódico mais recente e o relatório laboratorial correspondente, bem como um relatório que especifique os dados históricos de controlos positivos do laboratório nos quais se baseou a decisão de não efetuar um controlo positivo em paralelo;

Resultados:

— peso de cada rato no início da dosagem e na altura da sua eutanásia programada, bem como a média e o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) para cada grupo de tratamento,

— surgimento e evolução de sinais de toxicidade, incluindo irritação dérmica no local da aplicação (caso ocorra), para cada animal,

— quadro de valores de índices de marcação com bromodesoxiuridina e de índices de estimulação para cada grupo de tratamento, por rato,

— média e parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) do índice de marcação com bromodesoxiuridina/rato, para cada grupo de tratamento, e resultados da análise dos pontos aberrantes, também para cada grupo de tratamento,

▼M3

— índice de estimulação calculado e medida adequada da variabilidade de animal para animal, relativamente à substância em estudo e nos grupos de controlo,

— resposta à dosagem,

— análises estatísticas que se justifiquem;

Análise dos resultados:

— comentário breve sobre os resultados obtidos; análise da resposta à dosagem, análises estatísticas que se justifiquem e conclusão sobre a classificação, ou não, da substância em estudo como sensibilizante cutânea.

REFERÊNCIAS

(1) OCDE (2010). Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) Chamberlain, M., Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I., Loveless, S.E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999). The murine local lymph node assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249-257.

(10) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm].

▼M3

(11) ICCVAM (2009). Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K., Hoshuyama, S. (2005). Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.

(13) OCDE (1992), Skin Sensitisation. Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C., Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R., Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

(16) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7.ª edição. Washington, DC. National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].

(18) McGarry, H.F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W., Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.

(20) OCDE (2002). Acute Dermal Irritation/Corrosion. Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L., DeGeorge, G.L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S., Meade, B.J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P., Vohr, V.W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B., Meade, B.J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B., Meade, B.J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R., Vohr, H.W. (2005). A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.

(28) Vohr, H.W., Ahr, H.J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E., Germolec D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.

(30) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/ /Tox_workshop.htm].

(31) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(33) OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (33).

Substância de referência: Substância (sensibilizante ou não) utilizada como termo de comparação com a substância em estudo. Deve ter as seguintes propriedades: i) origem ou origens uniformes e fiáveis; ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo; iii) características físico-químicas conhecidas; iv) disponibilidade de dados sobre os efeitos conhecidos; e v) potência conhecida situada na gama de reação pretendida.

Falso negativo: Substância incorretamente considerada negativa ou inativa pelo método de ensaio, quando na realidade é positiva ou ativa (33).

Falso positivo: Substância incorretamente considerada positiva ou ativa pelo método de ensaio, quando na realidade é negativa ou inativa (33).

Perigo: Potencial de efeitos adversos na saúde ou no ambiente, que só se manifestam se o grau de exposição for suficiente.

Reprodutibilidade interlaboratorial: Medida do grau em que laboratórios qualificados diferentes, utilizando o mesmo protocolo para ensaiar a mesma substância em estudo, conseguem obter resultados qualitativa e quantitativamente similares. Determina-se durante os processos de pré-validação e de validação. Indica em que medida um ensaio pode ser transferido com êxito para outro laboratório e também se designa por «reprodutibilidade entre laboratórios» (33).

Reprodutibilidade intralaboratorial: Medida do grau em que pessoal qualificado do mesmo laboratório nele consegue repetir resultados com êxito, em momentos diferentes, utilizando o mesmo protocolo. Também se designa por «reprodutibilidade no laboratório» (33).

Ponto aberrante: Observação que difere marcadamente dos outros valores de uma amostra aleatória de uma população.

Garantia de qualidade: Processo de gestão no âmbito do qual a observância das normas de ensaio, das exigências e dos procedimentos de conservação de registos laboratoriais, bem como a exatidão dos dados transferidos, são avaliadas por pessoas independentes das que efetuam os ensaios.

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (33).

Sensibilização cutânea: Processo imunológico que se manifesta quando um indivíduo sensível é exposto, por via tópica, a um alergénio químico indutor de uma resposta imunológica cutânea passível de gerar sensibilização por contacto.

Índice de estimulação (IE): Valor calculado para quantificar o potencial de sensibilização cutânea das substâncias estudadas; corresponde à razão entre a proliferação nos grupos tratados e a proliferação no grupo de controlo do excipiente ensaiado em paralelo.

Substância em estudo (ou produto químico em estudo): Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

▼M4

B.52. TOXICIDADE AGUDA POR INALAÇÃO — MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 436 (2009) da OCDE. O primeiro método relativo à toxicidade aguda por inalação (*Test Guideline* TG 403) foi adotado em 1981 e posteriormente revisto — ver o capítulo B.2 (1) deste anexo. Depois da adoção de uma revisão do Método de Classificação de Toxicidade Aguda — capítulo B.1.tris deste anexo (5) —, justificava-se dispor de um método de classificação de toxicidade aguda por inalação (2)(3)(4). Uma avaliação retrospetiva deste método de classificação de toxicidade aguda por inalação revelou que o mesmo se adequa à utilização para efeitos de classificação e rotulagem (6). Neste método sequencial recorre-se a séries de concentrações visadas fixas para classificar a toxicidade de produtos químicos. Embora o parâmetro fundamental seja a letalidade, os animais que apresentem sinais de dor intensa, de grande aflição, em sofrimento ou moribundos devem ser eutanasiados, para lhes minimizar o sofrimento. O *Guidance Document* n.º 19 da OCDE (7) contêm orientações sobre os parâmetros eticamente mensuráveis.

2. O *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing* (GD 39) (8) contém orientações para a realização e interpretação deste método de ensaio.

3. No apêndice 1 e no referido GD 39 (8) definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

4. Este método permite obter informações sobre as propriedades perigosas e possibilita o escalonamento e a classificação de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 de produtos químicos causadores de toxicidade aguda (9). Caso sejam necessárias estimativas numéricas de valores de CL_{50} ou análises da resposta à concentração, o método adequado a utilizar é o descrito no capítulo B.2 (1) este anexo. Para mais orientações sobre a escolha do método de ensaio, consultar o documento GD 39 (8). Este método não se destina especificamente ao ensaio de materiais especiais, tais como matérias fibrosas ou isométricas pouco solúveis ou nanomateriais manufaturados.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

5. Antes de proceder a ensaios segundo este método, o laboratório deve ter em conta os elementos disponíveis sobre o produto químico, nomeadamente estudos já efetuados cujos resultados eventualmente dispensem a realização de mais ensaios, a fim de minimizar a utilização de animais. Entre os elementos úteis para a escolha da espécie, da estirpe, do sexo, do modo de exposição e das concentrações mais adequados contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, resultados de ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana e dados (Q)SAR — "(*quantitative) structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins. Não deve ensaiar-se por este método concentrações que presumivelmente causarão dor ou sofrimento intensos, devido a efeitos corrosivos [1] ou fortemente irritantes [ver o GD 39 (8)].

[1] A avaliação da corrosividade pode basear-se na apreciação de especialistas na matéria, tendo designadamente em conta elementos relativos a experiências em pessoas ou animais, dados *in vitro* disponíveis — por exemplo, provenientes dos capítulos B.40 (10) ou B.40.A (11) deste anexo ou do *Test Guideline 425* da OCDE (12) —, valores de pH, informações relativas a produtos químicos similares ou outros dados pertinentes.

▼M4

PRINCÍPIO DO MÉTODO

6. Com base num processo sequencial, obtêm-se informações sobre a toxicidade aguda do produto químico em estudo por inalação durante um período de exposição de quatro horas que são suficientes para o classificar. Por razões ligadas à regulamentação aplicável, a duração da exposição pode ser diferente. São ensaiados três animais de cada sexo em cada uma das etapas de concentração definidas. Consoante a mortalidade e/ou o número de animais moribundos, podem bastar duas etapas para ajuizar da toxicidade aguda do produto químico em estudo. Caso se verifique que um dos sexos é mais sensível do que o outro, pode prosseguir-se o ensaio apenas com o sexo mais sensível. O resultado de uma etapa determina o que fazer a seguir:

a) Não são necessários mais ensaios;

b) Ensaia-se três animais de cada sexo; ou

c) Ensaia-se seis animais apenas do sexo mais sensível — a estimativa do limite inferior da classe de toxicidade deve basear-se no ensaio de seis animais (independentemente do sexo) por grupo de concentração em estudo.

7. Os animais moribundos ou que apresentem sinais óbvios de dor ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados e, na interpretação dos resultados do ensaio, ser considerados do mesmo modo que os animais que morrem no ensaio. O documento de orientações n.º 19, relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (7), define os critérios que devem presidir à decisão de eutanasiar animais moribundos ou em grande sofrimento, bem como orientações sobre o reconhecimento da morte previsível ou iminente.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

8. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. A espécie preferida é o rato. É necessário justificar a utilização de outras espécies.

Preparação dos animais

9. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas. No dia da exposição, os animais devem ser adultos jovens com oito a 12 semanas, de peso corporal não desviado mais de 20 % do peso médio correspondente a cada sexo dos animais da mesma idade anteriormente expostos. Os animais devem ser selecionados aleatoriamente e marcados para identificação individual. Para aclimatação às condições laboratoriais, devem permanecer nas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início do ensaio. Durante um curto período antes do ensaio, também devem ser aclimatados ao dispositivo de ensaio, para diminuir a tensão causada por um ambiente novo.

Manutenção dos animais

10. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. O ideal será manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, embora isto possa não ser possível ao utilizar água como veículo. Antes e depois das exposições, os animais são geralmente engaiolados por sexo e por concentração, mas o número de animais por gaiola não deve dificultar a clara observação de cada animal e deve minimizar as perdas devidas a lutas ou canibalismo. Quando se opta pela exposição unicamente nasal dos animais, pode ser necessário aclimatá-los aos tubos de contenção. Estes não devem provocar aos animais tensões físicas, térmicas ou dinâmicas excessivas. A contenção dos animais pode afetar parâmetros fisiológicos como a temperatura corporal (hipertermia)

▼M4

e/ou o volume respirado por minuto. Caso se disponha de dados genéricos reveladores de que nenhuma destas alterações ocorre em grau apreciável, não será necessária a preadaptação aos tubos de contenção. Os animais cujo corpo seja exposto na totalidade a um aerossol devem permanecer em gaiolas individuais durante a exposição, para evitar que o aerossol seja filtrado pela pelagem dos que com eles coabitem. Exceto nos períodos de exposição, podem utilizar-se dietas convencionais certificadas de laboratório, com fornecimento ilimitado de água potável da rede pública. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão.

Câmaras de inalação

11. Ao escolher-se a câmara de inalação, deve ter-se em conta a natureza do produto químico em estudo e o objetivo do ensaio. Privilegia-se o modo de exposição unicamente nasal, termo que abrange as exposições "unicamente da cabeça", "unicamente do nariz" e "unicamente do focinho". A exposição unicamente nasal é geralmente preferida no estudo de aerossóis de líquidos ou de sólidos, ou de vapores que possam condensar-se e formar aerossóis. Para determinados objetivos do estudo, poderá ser melhor recorrer ao modo de exposição de corpo inteiro, mas será necessário justificá-lo no relatório. Para garantir estabilidade atmosférica nas câmaras de corpo inteiro, o volume de todos os animais presentes em cada câmara não deve exceder 5 % do volume da câmara. O documento GD 39 (8) descreve os princípios, vantagens e desvantagens das técnicas de exposição unicamente nasal e de corpo inteiro.

CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Administração das concentrações

12. Recomenda-se que a exposição tenha uma duração fixa de quatro horas, excluído o tempo para se estabelecer o equilíbrio. Em determinadas circunstâncias, podem ser necessários outros tempos de exposição, havendo que justificá-lo no relatório do estudo [ver o GD 39 (8)]. Os animais expostos em câmaras de corpo inteiro devem ser alojados individualmente, para evitar que animais coabitantes ingiram o produto químico em estudo ao lamberem-se uns aos outros. Durante o período de exposição, a alimentação deve ser suspensa. Durante as exposições de corpo inteiro pode continuar a fornecer-se água.

13. Os animais são expostos ao produto químico em estudo sob a forma de gás, vapor, aerossol ou de uma mistura destes. O estado físico a ensaiar depende das propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, da concentração escolhida e/ou da forma física cuja probabilidade de presença durante a manipulação e utilização do mesmo seja maior. Os produtos químicos higroscópicos ou quimicamente reativos devem ser ensaiados em atmosfera seca. Deve tomar-se precauções para evitar concentrações que possam provocar explosões.

Distribuição granulométrica

14. Os aerossóis e os vapores que possam condensar-se em aerossóis devem ser objeto de análise granulométrica. Para que todas as zonas pertinentes do aparelho respiratório sejam expostas, recomenda-se a utilização de aerossóis com diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) compreendido entre 1 μm e 4 μm e desvio-padrão geométrico (σ_g) compreendido entre 1,5 e 3,0 (8)(13)(14). Deve fazer-se o razoavelmente possível para respeitar estas condições, sendo necessário um parecer especializado caso isso não se consiga. Por exemplo, as partículas dos fumos metálicos podem ser mais pequenas do que o limite inferior indicado e as partículas carregadas, as fibras e as matérias higroscópicas (que aumentam de volume no ambiente húmido do aparelho respiratório) podem exceder o limite superior.

▼M4

Incorporação do produto químico em estudo num veículo

15. Pode utilizar-se um veículo para obter a concentração e a granulometria adequadas do produto químico na atmosfera. Regra geral, deve preferir-se a água. As matérias em partículas podem ser sujeitas a processos mecânicos destinados a obter a distribuição granulométrica necessária, mas tendo o cuidado de não decompor nem alterar o produto químico em estudo. Quando houver indícios de que um processo mecânico possa ter alterado a composição do produto químico em estudo (por exemplo, devido às altas temperaturas geradas pela fricção numa moagem excessiva), será necessário verificá-la por meios analíticos. Devem tomar-se as precauções adequadas para não contaminar o produto químico em estudo. Não é necessário ensaiar matérias granulosas não friáveis intencionalmente formuladas para não serem inaláveis. Para demonstrar que a manipulação de uma matéria granulosa não gera partículas respiráveis, efetua-se um ensaio de desgaste. Se este gerar partículas respiráveis, deve realizar-se um ensaio de toxicidade por inalação.

Animais de controlo

16. Não é necessário um grupo de controlo negativo (do ar) em paralelo. Caso se utilize um veículo diverso da água para gerar a atmosfera a ensaiar, só se utilizará um grupo de controlo do veículo se não se dispuser de dados históricos de toxicidade por inalação. Se um estudo de toxicidade de um produto químico incorporado num determinado veículo não revelar toxicidade, conclui-se que o veículo em causa não é tóxico à concentração ensaiada, não sendo necessário nenhum grupo de controlo do veículo.

MONITORIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Caudal de ar nas câmaras

17. Durante cada exposição, é necessário regular cuidadosamente, monitorizar continuamente e registar pelo menos de hora a hora o caudal de ar através de cada câmara. A monitorização da concentração (ou estabilidade) da atmosfera em estudo constitui uma medida permanente de todos os parâmetros dinâmicos e um meio indireto de regular os que intervêm na geração da atmosfera em estudo. É necessário ter especial cuidado em evitar reinalações nas câmaras de exposição unicamente nasal, evitando que o fluxo de ar através do sistema de exposição seja incapaz de produzir uma circulação dinâmica da atmosfera que contém o produto químico em estudo. Existem metodologias a que pode recorrer-se para demonstrar que não ocorrem reinalações nas condições experimentais escolhidas (8)(15). A concentração de oxigénio não deve ser inferior a 19 % e a concentração de dióxido de carbono não deve exceder 1 %. Se houver razões para crer que estas concentrações não são respeitadas, é necessário medi-las.

Temperatura e humidade relativa nas câmaras

18. Deve manter-se a temperatura nas câmaras a 22 °C ± 3 °C. Tanto no caso das exposições unicamente nasais como das exposições do corpo inteiro, é necessário monitorizar a humidade relativa na zona de respiração dos animais e registá-la pelo menos três vezes (duração do ensaio até quatro horas) ou de hora a hora (durações mais curtas). O ideal seria manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, mas isso pode não ser possível (por exemplo, quando se estudam misturas aquosas) ou pode não ser mensurável (devido a interferências do produto químico em estudo com o método de ensaio).

▼M4

Concentração nominal do produto químico em estudo

19. Sempre que possível, deve calcular-se e registar-se a concentração nominal na câmara de exposição. Esta é dada pela divisão da massa gerada do produto químico em estudo pelo volume de ar total que circulou pela câmara. A concentração nominal não é utilizada para caracterizar a exposição dos animais, mas a sua comparação com a concentração real dá uma indicação da eficácia de geração do sistema de ensaio, podendo ser utilizada para detetar problemas a esse nível.

Concentração real do produto químico em estudo

20. Entende-se por "concentração real do produto químico em estudo", a concentração do produto químico na zona de respiração dos animais da câmara de inalação. As concentrações reais podem determinar-se por métodos específicos (por exemplo, amostragem direta ou métodos de adsorção ou de reação química e posterior caracterização analítica) ou por métodos inespecíficos, tais como gravimetria após filtração. O método gravimétrico só é aceitável para aerossóis de pós com um único componente ou de líquidos pouco voláteis e deve apoiar-se em caracterizações adequadas específicas do produto químico em causa efetuadas antes da realização do estudo. A concentração de aerossóis de pós com vários componentes também pode determinar-se por gravimetria. Todavia, são necessários para isso dados analíticos que demonstrem que a composição do produto transportado no aerossol é semelhante à do produto inicial. Se não se dispuser desses dados, pode ser necessário reanalisar periodicamente o produto químico em estudo (idealmente no aerossol) durante o ensaio. No caso dos agentes aerossolizados que possam evaporar-se ou sublimar, é necessário demonstrar que todas as fases são recolhidas pelo método escolhido. As concentrações visadas, nominais e reais devem figurar no relatório do estudo, mas apenas as concentrações reais são utilizadas na análise estatística para cálculo dos valores letais de concentração.

21. Deve utilizar-se, se possível, apenas um lote do produto químico em estudo e a amostra em estudo deve ser conservada em condições que preservem a sua pureza, homogeneidade e estabilidade. Antes de iniciar o estudo, deve caracterizar-se o produto químico em causa no que respeita à sua pureza e, se tecnicamente viável, à sua identidade e às quantidades dos contaminantes e impurezas nele identificados. Para o efeito, pode recorrer-se, entre outros, aos seguintes dados: tempos de retenção e áreas relativas de picos, pesos moleculares obtidos por espetrometria de massa ou cromatografia em fase gasosa ou outras estimativas. Embora a identidade da amostra a estudar não seja da responsabilidade do laboratório, pode ser aconselhável que este confirme, pelo menos, alguns aspetos da caracterização efetuada pelo cliente (cor, natureza física, etc.).

22. Deve manter-se a atmosfera de exposição tão constante quanto possível e proceder-se à sua monitorização continuamente e/ou intermitentemente, consoante o método de análise. Caso se proceda a uma colheita de amostras intermitente, num estudo de quatro horas deve recolher-se uma amostra da atmosfera da câmara pelo menos duas vezes. Se isso não for viável, por limitações relacionadas com o caudal de ar ou devido a concentrações baixas, pode colher-se uma amostra ao longo de todo o período de exposição. Se ocorrerem variações pronunciadas de uma amostra para outra, devem colher-se quatro amostras por exposição nas concentrações seguintes. A concentração na câmara correspondente a uma determinada amostra não deve desviar-se da concentração média na câmara mais de 10 %, no caso de gases e vapores, nem mais de 20 %, no caso de aerossóis de líquidos ou de sólidos. Deve calcular-se e registar-se o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio (t_{95}). A duração da exposição corresponde ao tempo de geração do produto químico em estudo, incluído o tempo necessário para atingir t_{95}. O documento GD 39 (8) contém orientações para a estimativa do t_{95}.

▼M4

23. No caso de misturas muito complexas de vapores ou gases e de aerossóis (por exemplo, atmosferas de combustão e produtos químicos gerados por produtos ou dispositivos finais específicos), o comportamento de cada fase na câmara de inalação pode ser diferente. Por esse motivo, deve escolher-se em cada fase (vapor ou gás e aerossol) pelo menos uma substância indicadora (substância analisada), normalmente a principal substância ativa da mistura. Se o produto químico em estudo for uma mistura, deve indicar-se no relatório a concentração analítica correspondente à mistura e não apenas a concentração correspondente ao ingrediente ativo ou ao componente (substância analisada) em causa. O documento GD 39 (8) contém mais informações sobre as concentrações reais.

Distribuição granulométrica do produto químico em estudo

24. Deve determinar-se a distribuição granulométrica dos aerossóis pelo menos duas vezes durante cada exposição de quatro horas, recorrendo a um impactor de cascata ou a outro instrumento, tal como um granulómetro aerodinâmico. Se for possível demonstrar a equivalência dos resultados obtidos pelo impactor de cascata e pelo instrumento alternativo, pode utilizar-se este último em todo o estudo. Em paralelo ao instrumento primário, deve utilizar-se um segundo dispositivo, tal como um filtro gravimétrico ou um borbulhador de gás/impactor *impinger*, para confirmar a eficiência de captação do primeiro. As concentrações mássicas obtidas por análise granulométrica e por análise com filtros não devem diferir entre si mais do que valores razoáveis [ver o GD 39 (8)]. Se for possível demonstrar esta equivalência no início do estudo, não é necessário efetuar mais medições de confirmação. Por razões de bem-estar animal, devem tomar-se medidas para minimizar dados inconclusivos que possam obrigar à repetição de exposições. É necessário efetuar uma análise granulométrica no caso dos vapores que possam condensar-se para formar aerossóis ou se forem detetadas partículas numa atmosfera de vapores suscetível de formar fases mistas (ver o ponto 14).

PROCEDIMENTO

Ensaio principal

25. Utiliza-se em cada etapa três animais de cada sexo ou seis animais do sexo mais sensível. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Para dose inicial, escolhe-se, das quatro concentrações fixas, a que tenha mais probabilidade de produzir efeitos tóxicos em alguns dos animais expostos. Os esquemas de ensaio para gases, vapores e aerossóis constantes dos apêndices 2 a 4 representam o procedimento a seguir em função dos valores-limite das categorias de classificação, rotulagem e embalagem 1 a 4 estabelecidos (9) para gases (100, 500, 2 500, 20 000 ppm durante 4 h, apêndice 2), vapores (0,5, 2, 10, 20 mg/l durante 4 h, apêndice 3) e aerossóis (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l durante 4 h, apêndice 4). A categoria 5, que o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (9) não prevê, aplica-se às concentrações acima do limite correspondente. A cada concentração inicial aplica-se o esquema de ensaio respetivo. O procedimento de ensaio consiste em seguir no fluxograma as setas correspondentes ao número de animais eutanasiados ou que morreram, até ser possível atribuir uma categoria.

26. O intervalo de tempo entre a exposição dos diversos grupos é determinado pelo aparecimento, pela duração e pela intensidade dos sinais de toxicidade observados. Não se expõem animais ao nível de concentração seguinte enquanto não houver um grau razoável de confiança na sobrevivência dos últimos animais expostos. Recomenda-se um período de três ou quatro dias entre a exposição a cada nível de concentração, de modo a permitir a observação de efeitos tóxicos retardados. Se necessário, o intervalo de tempo pode ser ajustado, por exemplo, em caso de respostas inconclusivas.

▼M4

Ensaio do limite

27. Efetua-se este ensaio caso se saiba ou preveja que o produto químico em estudo é praticamente não tóxico, isto é, só induzirá toxicidade acima da concentração-limite prevista na regulamentação aplicável. Podem obter-se informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo a partir de ensaios já realizados com substâncias ou misturas semelhantes, tomando em consideração a identidade e percentagem dos componentes de importância toxicológica reconhecida. Nos casos em que se disponha de pouca ou nenhuma informação sobre a toxicidade do produto químico em estudo ou quando este for previsivelmente tóxico, deve efetuar-se o estudo principal — o documento GD 39 (8) contém mais orientações.

28. Seguindo o procedimento normal, constitui ensaio do limite neste método de ensaio expor três animais de cada sexo, ou seis animais do sexo mais sensível, às concentrações de 20 000 ppm (gases), 20 mg/l (vapores) e 5 mg/l (poeiras e nebulizados), se for possível atingi-las. Ao ensaiar aerossóis, o principal objetivo é conseguir obter partículas de dimensões respiráveis (MMAD compreendido entre 1 μm e 4 μm), o que, com a maior parte dos produtos químicos, se consegue a uma concentração de 2 mg/l. Só deve tentar-se ensaiar aerossóis a concentrações superiores a 2 mg/l se for possível gerar partículas de dimensões respiráveis [ver o GD 39 (8)]. Por razões de bem-estar animal, o sistema GHS (16) desaconselha o ensaio de concentrações superiores à concentração-limite. Só importa ponderar a realização de ensaios relativos à categoria 5 do sistema GHS (16), não prevista no Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (9), se for elevada a probabilidade de os resultados desses ensaios terem interesse direto para a proteção da saúde humana, o que deve justificar-se no relatório do estudo. No caso de produtos químicos potencialmente explosivos, deve tomar-se precauções para evitar condições favoráveis à ocorrência de explosões. Para evitar a utilização desnecessária de animais, deve efetuar-se um ensaio sem animais antes do ensaio do limite, para verificar se é possível atingir as condições deste ensaio nas câmaras.

EXAMES

29. Os animais devem ser examinados clinicamente com frequência durante o período de exposição. Depois desta, deve efetuar-se um exame clínico pelo menos duas vezes no dia da exposição — ou mais vezes, quando a resposta dos animais à exposição o aconselhar — e pelo menos uma vez por dia em seguida, durante 14 dias. Não é fixada uma duração do período de observação, que deve depender da natureza e do momento do aparecimento de sinais clínicos, assim como da duração do período de recuperação. O momento do aparecimento e do desaparecimento dos sinais de toxicidade é importante, nomeadamente se houver uma certa demora na manifestação desses sinais. Todas as observações devem ser sistematicamente registadas, mantendo registos individuais para cada animal. Os animais moribundos ou que apresentem sinais de dor intensa e/ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados, por razões de bem-estar animal. No exame clínico de sinais de toxicidade, não devem confundir-se um mau aspeto inicial e alterações respiratórias passageiras, imputáveis ao procedimento de exposição, com efeitos decorrentes da exposição propriamente dita. Devem ser tidos em conta os princípios e critérios resumidos no documento de orientações relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (7). Se forem eutanasiados animais ou forem encontrados animais mortos, deve registar-se o momento da morte com a maior exatidão possível.

▼M4

30. Os exames a efetuar aos animais engaiolados devem incidir, nomeadamente, nas alterações da pele e da pelagem, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do sistema circulatório, dos sistemas nervosos autónomo e central, da atividade somatomotora e do comportamento. Se possível, registar as diferenças eventualmente observadas entre efeitos locais e sistémicos. Deve estar-se atento a tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. A medição da temperatura retal pode corroborar uma bradipneia reflexa ou uma hipo/hipertermia relacionadas com a exposição ou com o confinamento.

Peso corporal

31. Regista-se o peso de cada animal uma vez durante o período de aclimatação, no dia da exposição, antes desta (dia 0), e, pelo menos, nos dias 1, 3 e 7 (e posteriormente uma vez por semana), bem como no momento da morte ou da eutanásia, se posterior ao dia 1. O peso corporal é reconhecidamente um indicador crítico de toxicidade, pelo que é necessário observar atentamente os animais cujo peso decresça 20 % ou mais relativamente ao peso anterior ao estudo e não volte a aumentar. No final do período após a exposição, pesa-se e eutanasia-se os animais sobreviventes.

Patologia

32. Os animais utilizados nos ensaios (incluindo os que morrerem durante o ensaio ou que forem eutanasiados e retirados do estudo por razões de bem-estar animal) devem ser sujeitos a uma autópsia macroscópica. Se não for possível realizar a autópsia imediatamente depois de detetada a morte do animal, este deve ser refrigerado (não congelado) a uma temperatura suficientemente baixa para minimizar a autólise. As autópsias devem ser efetuadas o mais rapidamente possível, normalmente não mais de um ou dois dias após a morte. Regista-se todas as alterações patológicas macroscópicas de cada animal, prestando especial atenção às alterações do aparelho respiratório.

33. Pode efetuar-se outros exames previamente previstos para alargar o valor interpretativo do estudo, tais como a pesagem dos pulmões dos ratos sobreviventes e/ou a pesquisa, por exame microscópico, de irritações do aparelho respiratório. Também podem examinar-se os órgãos que evidenciem macropatologias de animais que tenham sobrevivido 24 horas ou mais, bem como órgãos que se saiba serem afetados ou que se preveja serem-no. O exame microscópico de todo o aparelho respiratório pode fornecer elementos úteis no caso dos produtos químicos que reagem com a água, tais como os ácidos e os produtos químicos higroscópicos.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

34. Devem ser indicados o peso corporal e os resultados da autópsia de cada animal. Deve resumir-se os resultados dos exames clínicos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentaram sinais específicos de toxicidade, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados e o momento da morte de cada animal, complementados por uma descrição dos efeitos tóxicos e da evolução e reversibilidade destes, bem como pelos resultados das autópsias.

▼M4

Relatório dos ensaios

35. Elementos a constar, quando pertinente, do relatório dos ensaios:

Animais estudados e condições em que são mantidos

— descrição das condições de engaiolamento, nomeadamente: número (ou alteração do número) de animais por gaiola, camas, temperatura e humidade relativa ambientes, fotoperíodo e dieta,

— espécie e estirpe utilizadas e, caso não sejam utilizados ratos, justificação da utilização de outra espécie,

— número, idade e sexo,

— método de aleatorização,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— descrição de eventuais condicionamentos anteriores ao ensaio, nomeadamente ao nível da dieta, de quarentenas e do tratamento de doenças.

Produto químico em estudo

— natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas pertinentes (incluindo a isomerização),

— dados de identificação e, se for conhecido, número de registo CAS (*Chemical Abstract Service*).

Veículo

— justificação da utilização e da escolha do veículo (se não for água),

— dados históricos ou paralelos demonstrativos de que o veículo não interfere nos resultados do estudo.

Câmaras de inalação

— descrição – incluindo dimensões e volume – das câmaras de inalação,

— origem e descrição do equipamento utilizado na exposição dos animais e na geração da atmosfera,

— equipamento de medição da temperatura, humidade, granulometria e concentração real,

— fonte de ar, tratamento do ar fornecido/evacuado e sistema de climatização utilizado,

— métodos utilizados para calibrar o equipamento a fim de garantir a homogeneidade da atmosfera ensaiada,

— subpressão ou sobrepressão,

— pontos de exposição por câmara (de exposição unicamente nasal); localização dos animais no sistema (câmara de exposição de corpo inteiro),

— homogeneidade/estabilidade no tempo da atmosfera ensaiada,

— localização nas câmaras dos sensores térmicos e higrométricos e dos pontos de colheita de amostras da atmosfera ensaiada,

— caudais de ar, caudal de ar em cada ponto de exposição (exposição unicamente nasal) ou relação entre o volume ocupado pelos animais e o volume da câmara (câmara de exposição de corpo inteiro),

— informações sobre o equipamento eventualmente utilizado para medir o oxigénio e o dióxido de carbono,

▼M4

— tempo necessário para as câmaras de inalação atingirem o equilíbrio (t_{95}),

— número horário de substituições de volume,

— medidores (se existirem).

Elementos relativos à exposição

— fundamentação da escolha da concentração visada no estudo principal,

— concentrações nominais (dadas pela divisão da massa do produto químico em estudo introduzido na câmara de inalação pelo volume de ar total que nela circulou),

— concentrações reais do produto químico em estudo obtidas na zona de respiração dos animais; no caso das misturas estudadas que geram formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerossóis), pode analisar-se separadamente cada uma delas,

— as concentrações no ar devem indicar-se em unidades de massa (mg/l, mg/m^3, etc.); podem igualmente indicar-se unidades de volume (ppm, ppb, etc.) entre parêntesis,

— distribuição granulométrica, diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) e desvio-padrão geométrico (σ_g), incluindo os métodos de cálculo correspondentes; indicar também o resultado de cada análise granulométrica efetuada.

Condições de realização dos ensaios

— elementos sobre a preparação do produto químico estudado, nomeadamente sobre eventuais métodos de redução da granulometria de sólidos ou de preparação de soluções do produto químico. Se o recurso a processos mecânicos for passível de ter alterado a composição do produto químico em estudo, incluir os resultados das análises efetuadas para verificar a composição deste,

— descrição (de preferência complementada por um esquema) do equipamento utilizado para gerar a atmosfera ensaiada e para expor os animais a essa atmosfera,

— elementos sobre o método de análise química utilizado e sobre a validação desse método (incluindo o rendimento da recuperação do produto químico em estudo do meio amostrado),

— Fundamentação da escolha das concentrações utilizadas nos ensaios.

Resultados

— quadro com a temperatura, a humidade e o caudal de ar nas câmaras,

— quadro com as concentrações nominais e reais nas câmaras,

— quadro com os dados granulométricos, nomeadamente dados analíticos sobre a colheita de amostras, a distribuição granulométrica e os cálculos de MMAD e σ_g,

— quadro com os dados de resposta e as concentrações correspondentes a cada animal (animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, e natureza, intensidade e duração dos efeitos),

— pesos corporais de cada animal registados durante os dias do estudo, bem como a data e o momento da morte, se anterior à eutanásia programada; aparecimento, evolução e eventual reversibilidade de sinais de toxicidade em cada animal,

▼M4

— resultados da autópsia e resultados histopatológicos correspondentes a cada animal, se disponíveis,

— categoria no sistema de classificação, embalagem e rotulagem e valor-limite da CL_{50}.

Discussão e interpretação dos resultados

— deve ser dada especial atenção à descrição dos métodos utilizados para satisfazer os critérios deste método de ensaio, nomeadamente no que respeita à concentração-limite e à granulometria,

— examinar em que medida, com base nos resultados globais, as partículas são respiráveis, em especial se os critérios granulométricos não forem satisfeitos,

— a apreciação global do estudo deve incidir igualmente na coerência dos métodos utilizados para determinar as concentrações nominal e real e deve dar conta da relação entre estas concentrações,

— referir a causa provável da morte e o modo de ação predominante (sistémico ou local),

— explicar por que razão terá sido necessário eutanasiar animais que apresentavam sinais de dor ou de grande sofrimento continuado, com base nos critérios do documento de orientações da OCDE relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (7).

REFERÊNCIAS:

1) Capítulo B.2 deste anexo, "Toxicidade aguda (inalação)".

2) Holzhütter H.-G., Genschow E., Diener W., Schlede E. (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77:243-254.

3) Diener W., Kayser D., Schlede E. (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71:537-549.

4) Diener W., Schlede E. (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1:129-134.

5) Capítulo B.1.tris deste anexo, "Toxicidade oral aguda – Método de classificação de toxicidade aguda".

6) OCDE (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105. OCDE, Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

7) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39. OCDE, Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

9) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

10) Capítulo B.40 deste anexo, "Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio da resistência elétrica transcutânea (RET)".

11) Capítulo B.40.A deste anexo, "Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio em modelos de pele humana".

12) OCDE (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OCDE Guideline for testing of chemicals No. 435. OCDE, Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

13) Phalen R.F. (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques (2.ª edição). Informa Healthcare, New York.

14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18:321-327.

15) Pauluhn J., Thiel A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27:160-167.

16) ONU (2007). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30, ONU, Nova Iorque e Genebra. Disponível em http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ /ghs_welcome_e.html.

▼**M4**

Apêndice 1

DEFINIÇÃO

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M4

Apêndice 2

Procedimento a seguir para gases em função da concentração (ppm) INICIAL (4 h)

Observações gerais ([1])

Esquematiza-se neste apêndice o procedimento de ensaio a seguir consoante a concentração inicial.

Apêndice 2a: concentração inicial de 100 ppm;

Apêndice 2b: concentração inicial de 500 ppm;

Apêndice 2c: concentração inicial de 2 500 ppm;

Apêndice 2d: concentração inicial de 20 000 ppm.

O procedimento de ensaio segue as setas correspondentes ao número de animais eutanasiados ou que morreram.

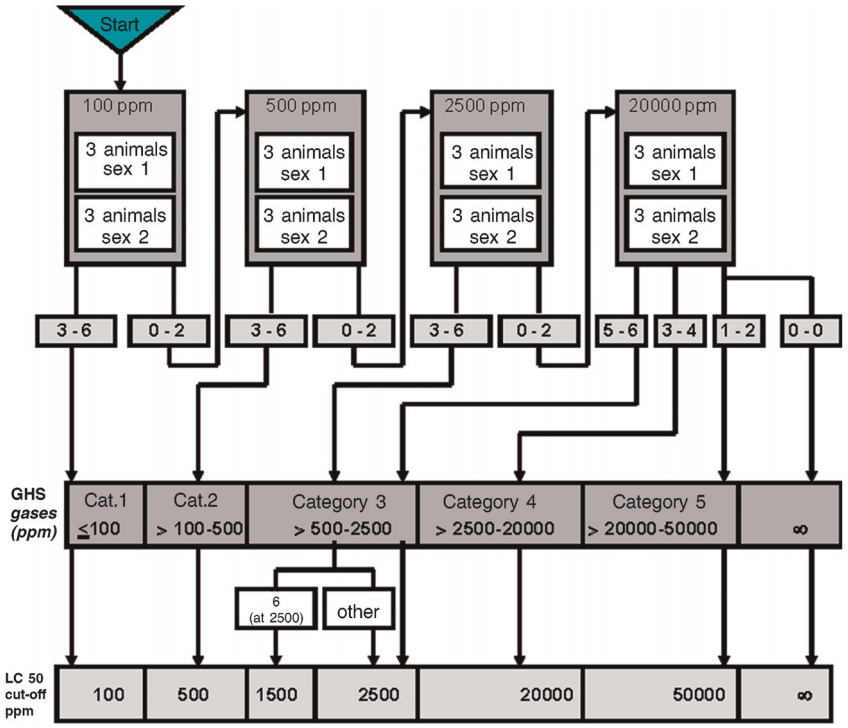
([1]) Os quadros seguintes reportam-se ao sistema GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos). O equivalente na União Europeia é o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (9), que não prevê a categoria 5 para a toxicidade aguda por inalação.

▼M4

Apêndice 2a

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 100 ppm/4 h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

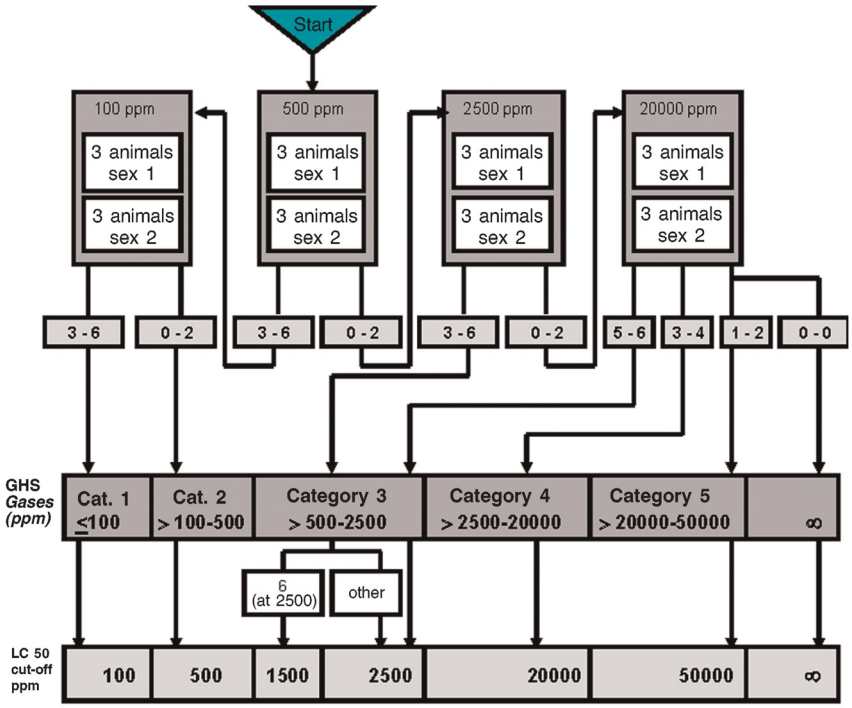
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 2b

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

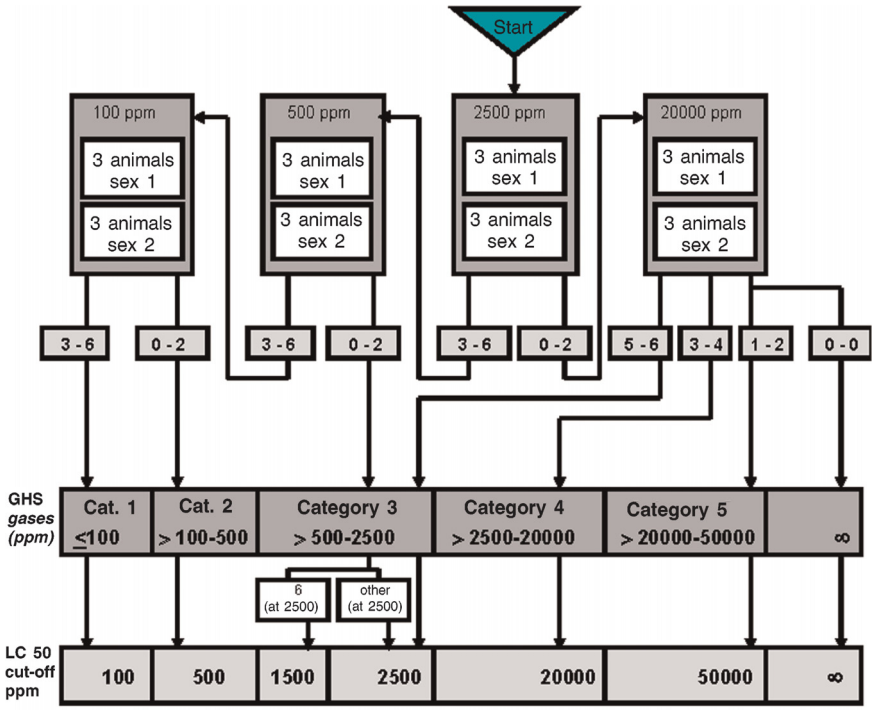
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 2c

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 2 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

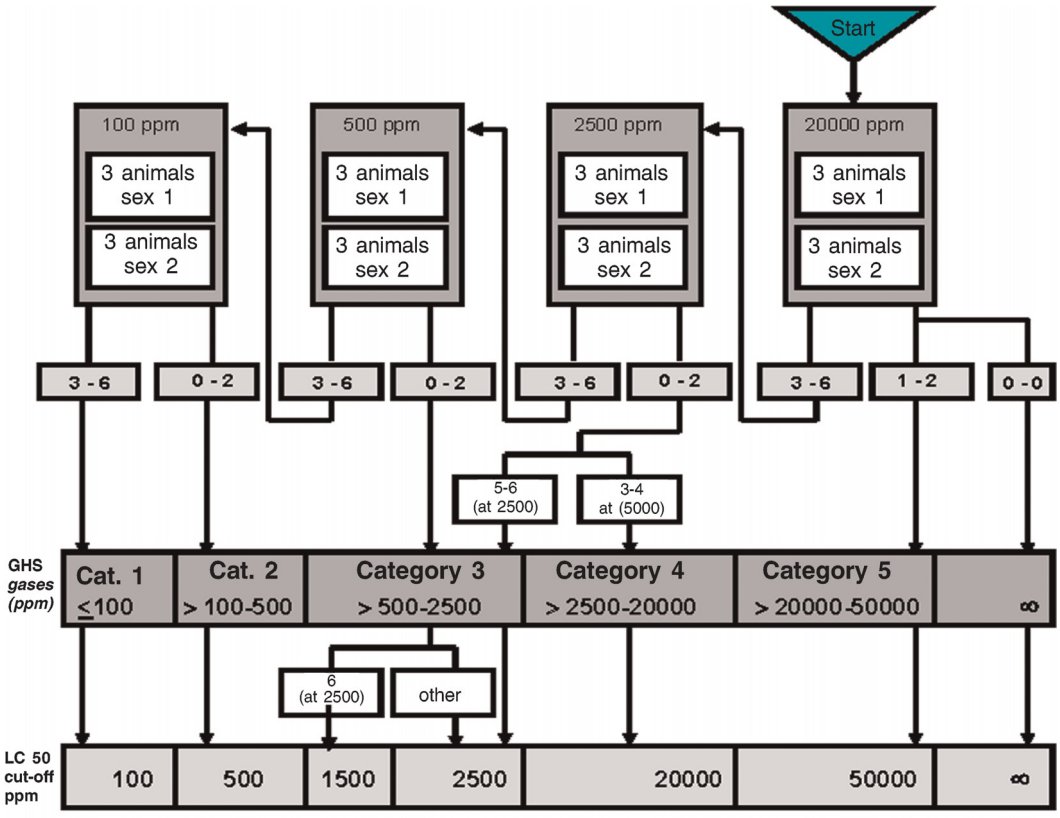
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 2d

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 20 000 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 3

Procedimento a seguir para vapores em função da concentração (mg/l) inicial (4 h)

Observações gerais ([1])

Esquematiza-se neste apêndice o procedimento de ensaio a seguir consoante a concentração inicial.

Apêndice 3a: concentração inicial de 0,5 mg/l;

Apêndice 3b: concentração inicial de 2,0 mg/l;

Apêndice 3c: concentração inicial de 10 mg/l;

Apêndice 3d: concentração inicial de 20 mg/l.

O procedimento de ensaio segue as setas correspondentes ao número de animais eutanasiados ou que morreram.

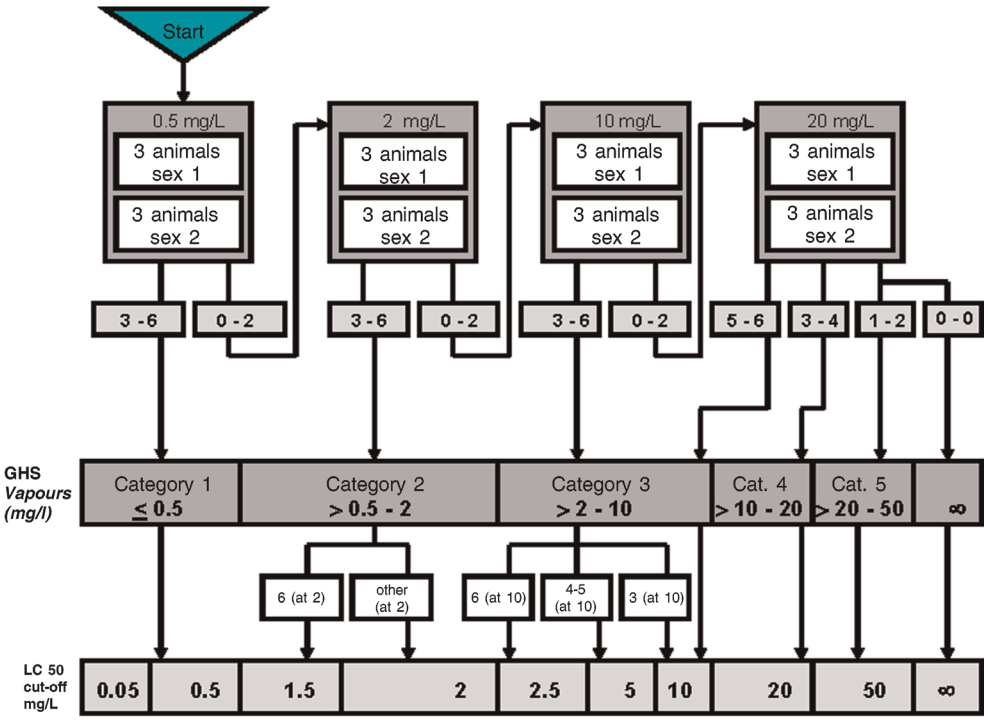
([1]) Os quadros seguintes reportam-se ao sistema GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos). O equivalente na União Europeia é o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (9), que não prevê a categoria 5 para a toxicidade aguda por inalação.

▼M4

Apêndice 3a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,5 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

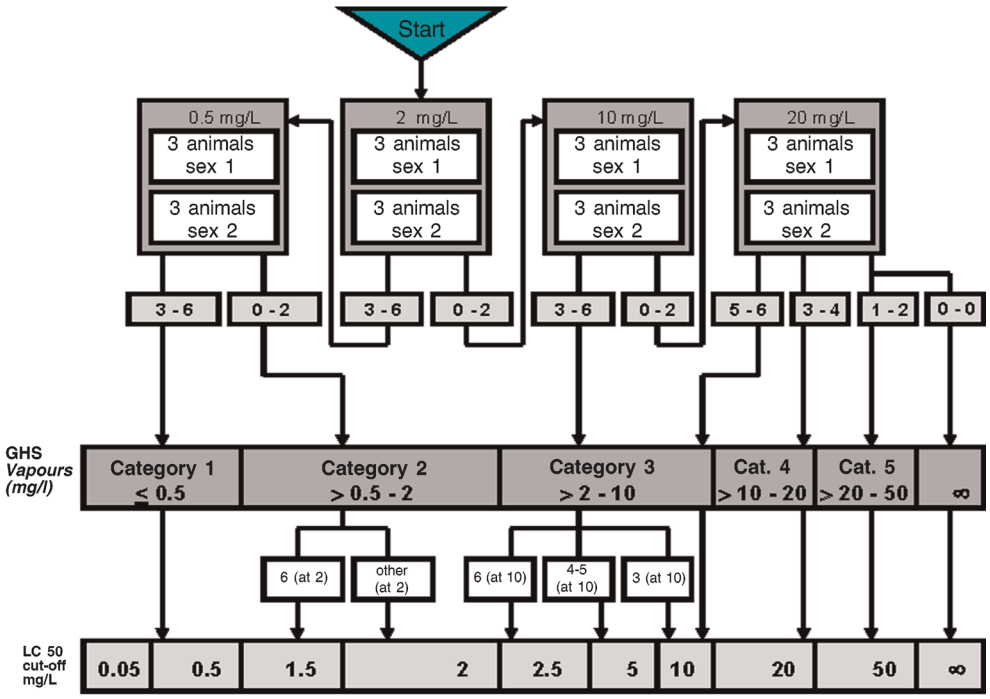
— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 3b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 2 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

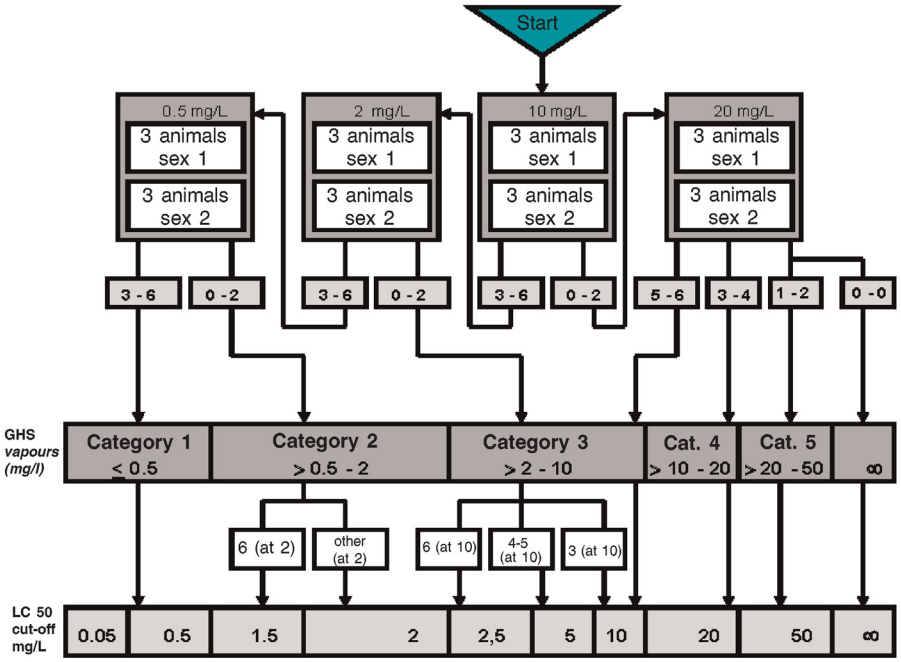
— Testing at 50 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 3c

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 10 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used pers step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

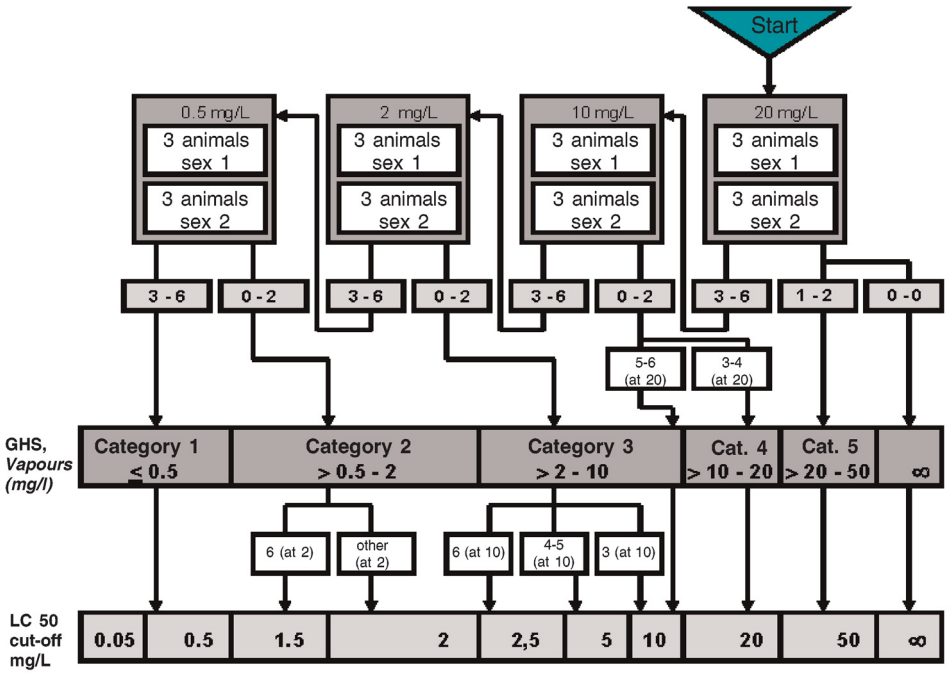
— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 3d

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 20 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39(8)

▼M4

Apêndice 4

procedimento a seguir para aerossóis em função da concentração (mg/l) inicial (4 h)

Observações gerais ([1])

Esquematiza-se neste apêndice o procedimento de ensaio a seguir consoante a concentração inicial.

Apêndice 4a: concentração inicial de 0,05 mg/l;

Apêndice 4b: concentração inicial de 0,5 mg/l;

Apêndice 4c: concentração inicial de 1 mg/l;

Apêndice 4d: concentração inicial de 5 mg/l.

O procedimento de ensaio segue as setas correspondentes ao número de animais eutanasiados ou que morreram.

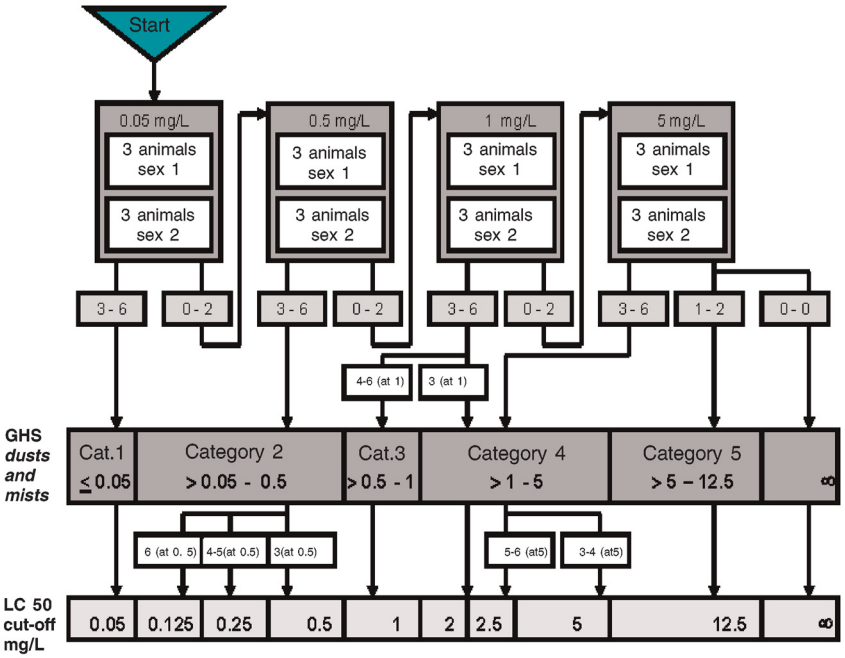
([1]) Os quadros seguintes reportam-se ao sistema GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos). O equivalente na União Europeia é o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (9), que não prevê a categoria 5 para a toxicidade aguda por inalação.

▼M4

Apêndice 4a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,05 mg/L/4h for vapours



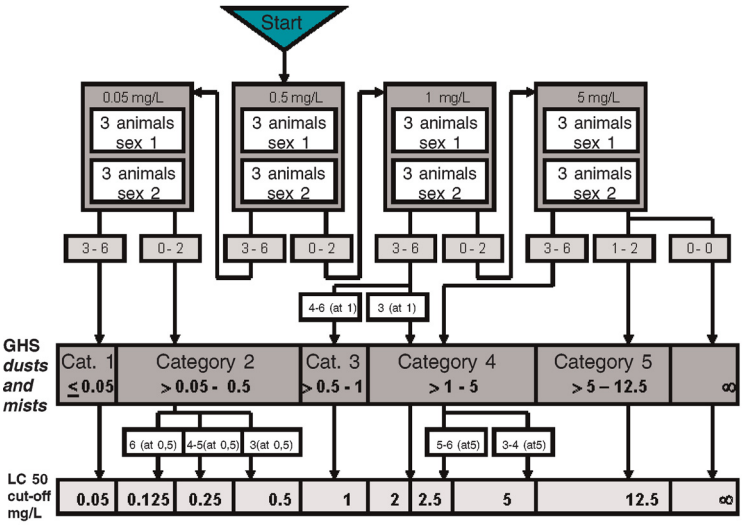
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 4b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,5 mg/L/4h for aerosols



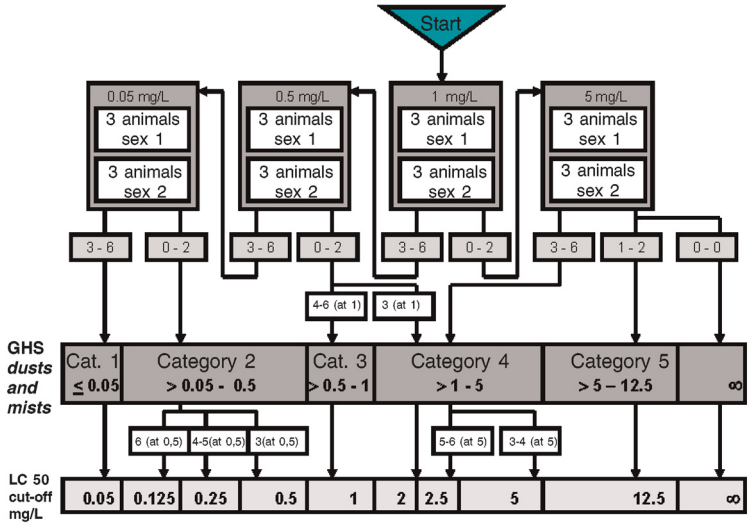
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 4c

Acute inhalation toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 1 mg/L/4h for aerosols



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

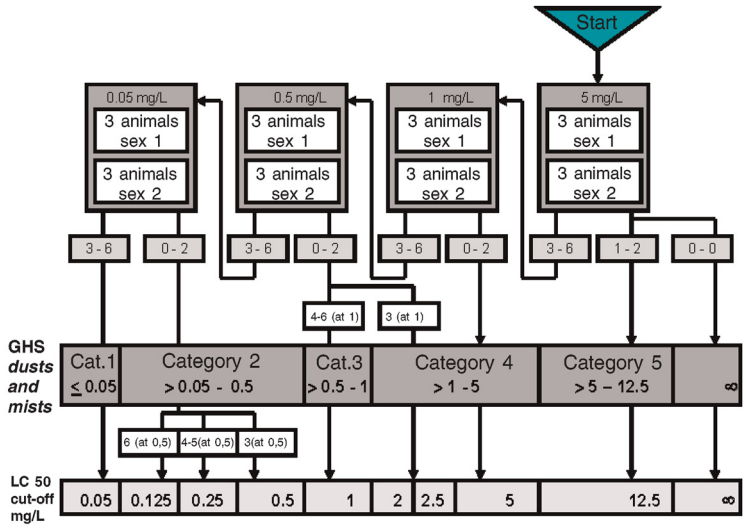
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 4d

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 5 mg/L/4h for aerosols



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6 : Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)»

▼B

PARTE C: MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ECOTOXICIDADE

ÍNDICE

C.1.	TOXICIDADE AGUDA PARA OS PEIXES
C.2.	ENSAIO DE IMOBILIZAÇÃO AGUDA DA *DAPHNIA* SP.
C.3.	CIANOBACTÉRIAS E ALGAS DE ÁGUA DOCE, ENSAIO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO
C.4.	DETERMINAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE «FÁCIL»
PARTE I.	CONSIDERAÇÕES GERAIS
PARTE II.	ENSAIO DA REDUÇÃO GRADUAL DO COD (método C.4-A)
PARTE III.	TESTE DE DESPISTE DA OCDE MODIFICADO (método C.4-B)
PARTE IV.	ENSAIO DA LIBERTAÇÃO DE CO_2 (método C.4-C)
PARTE V.	ENSAIO DE RESPIROMETRIA MANOMÉTRICA (método C.4-D)
PARTE VI.	ENSAIO EM FRASCO FECHADO (método C.4-E)
PARTE VII.	ENSAIO DE M.I.T.I. (método C.4-F)
C.5	DEGRADAÇÃO — CARÊNCIA BIOQUÍMICA DE OXIGÉNIO
C.6.	DEGRADAÇÃO — CARÊNCIA QUÍMICA DE OXIGÉNIO
C.7.	DEGRADAÇÃO — DEGRADAÇÃO ABIÓTICA: HIDRÓLISE EM FUNÇÃO DO PH
C.8.	TOXICIDADE EM RELAÇÃO ÀS MINHOCAS
C.9.	BIODEGRADAÇÃO — ENSAIO DE ZAHN E WELLENS
C.10.	ENSAIO DE SIMULAÇÃO DO TRATAMENTO AERÓBIO DE EFLUENTES C.10-A: UNIDADES DE LAMAS ATIVADAS — C.10-B BIOFILMES
C.11.	BIODEGRADAÇÃO — LAMAS ACTIVADAS: ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA RESPIRAÇÃO
C.12.	BIODEGRADAÇÃO — ENSAIO L.A.S.C. MODIFICADO
C.13.	BIOCONCENTRAÇÃO: ENSAIO DINÂMICO COM PEIXE
C.14.	ENSAIO DE CRESCIMENTO JUVENIL EM PEIXE
C.15.	ENSAIO DE TOXICIDADE DE CURTO PRAZO NOS PEIXES EM ESTÁDIO EMBRIONÁRIO E RECÉM-NASCIDOS
C.16.	ABELHAS DOMÉSTICAS — ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL AGUDA
C.17.	ABELHAS DOMÉSTICAS — ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA POR CONTACTO
C.18.	ADSORÇÃO/DESSORÇÃO POR RECURSO A UM MÉTODO DE EQUILÍBRIO POR LOTES DE SOLO

▼**B**

C.19.	ESTIMATIVA DO VALOR DO COEFICIENTE DE ADSORÇÃO *(K_{OC})* EM SOLOS E EM LAMAS DE DEPURAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)
C.20.	ENSAIO SOBRE A REPRODUÇÃO DA *DAPHNIA MAGNA*
C.21.	MICROORGANISMOS NO SOLO: ENSAIO DE TRANSFORMAÇÃO DE AZOTO
C.22.	MICROORGANISMOS NO SOLO: ENSAIO DE TRANSFORMAÇÃO DE CARBONO
C.23.	TRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS E ANAERÓBIAS NO SOLO
C.24.	TRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS E ANAERÓBIAS EM SISTEMAS DE SEDIMENTOS AQUÁTICOS
C.25.	MINERALIZAÇÃO AERÓBICA EM ÁGUAS DE SUPERFÍCIE — ENSAIO DE SIMULAÇÃO DE BIODEGRADAÇÃO
C.26.	ENSAIO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO COM *LEMNA* SPP.

▼**M4**

C.27.	ENSAIO DE TOXICIDADE EM QUIRONOMÍDEOS NUM SISTEMA SEDIMENTOS-ÁGUA COM SEDIMENTOS ENRIQUECIDOS
C.28.	ENSAIO DE TOXICIDADE EM QUIRONOMÍDEOS NUM SISTEMA SEDIMENTOS-ÁGUA COM ÁGUA ENRIQUECIDA
C.29.	BIODEGRADABILIDADE "FÁCIL" — CO_2 EM RECIPIENTES FECHADOS (Ensaio do espaço livre)
C.30.	BIOACUMULAÇÃO EM OLIGOQUETAS TERRESTRES

▼B

C.1. **TOXICIDADE AGUDA PARA OS PEIXES**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo deste ensaio consiste em determinar a toxicidade letal aguda de uma substância para os peixes de água-doce. Tanto quanto possível é desejável possuir informações sobre a solubilidade na água, a pressão de vapor, a estabilidade química, as constantes de dissociação e a biodegradabilidade da substância para auxiliar a seleccionar o método de ensaio mais apropriado (estático, semiestático ou por escoamento) para garantir concentrações constantes satisfatórias da substância de ensaio durante o período desse ensaio.

Ao fazer-se o planeamento do ensaio e a interpretação dos resultados devem tomar-se em consideração as informações adicionais disponíveis (por exemplo, fórmula estrutural, grau de pureza, natureza e percentagem das impurezas significativas, presença e quantidades de aditivos, coeficiente de partição n-octanol/água).

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

A toxicidade aguda é o efeito adverso perceptível induzido num organismo ao fim de um curto período de tempo (alguns dias) de exposição a uma substância. Neste ensaio, exprime-se a toxicidade aguda pelo valor da concentração letal cinquenta (CL_{50}), isto é, a concentração em água que mata 50 % dos peixes que constituem o grupo submetido a ensaio decorrido um período contínuo de exposição o qual deve ser especificado.

Todas as concentrações da substância de ensaio são dadas em peso por volume (miligramas por litro). As concentrações também podem ser expressas em peso por peso (mg/kg^{-1}).

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Pode fazer-se o ensaio com uma substância de referência para se demonstrar que, sob as condições de ensaio laboratoriais, a resposta das espécies testadas não se modificou significativamente.

Para este ensaio não estão especificadas quaisquer substâncias de referência.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Pode efectuar-se um teste-limite para a concentração de 100 mg por litro no sentido de se demonstrar que o valor CL_{50} é superior a esta concentração.

Os peixes são expostos à substância de ensaio misturada com água, num determinado intervalo de concentrações, durante um período de 96 horas. Procede-se ao registo do número de mortes em intervalos de 24 horas pelo menos e calcula-se, sempre que possível, as concentrações que matam 50 % dos peixes (CL_{50}) em cada momento de observação.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Os critérios de qualidade deverão ser aplicados ao teste-limite e também no método do teste global.

A mortalidade nos controlos não deve exceder o valor de 10 % (ou um peixe no caso de se utilizar menos de dez peixes) no termo do ensaio.

A concentração do oxigénio dissolvido deve ser superior a 60 % do valor da saturação com ar.

▼B

A concentração da substância de ensaio deverá ser mantida a cerca de 80 % do valor da concentração inicial, ao longo do período de duração do ensaio.

Para as substâncias que se dissolvem facilmente no meio de ensaio, dando origem a soluções estáveis, isto é, para as substâncias que não são significativamente volatilizáveis, degradáveis, hidrolisáveis ou adsorvidas, pode considerar-se a concentração inicial como equivalente ao valor da concentração nominal. Dever-se-á demonstrar que as concentrações foram mantidas durante todo o ensaio e que os critérios de qualidade foram satisfeitos.

Para as substâncias que são:

i) fracamente solúveis no meio de ensaio, ou

ii) susceptíveis de formar emulsões ou dispersões estáveis, ou

iii) instáveis em soluções aquosas,

pode considerar-se a concentração inicial como sendo a concentração medida na solução (ou, no caso de ser tecnicamente impossível, medida na coluna de água) no início do ensaio. A concentração deverá ser determinada após um período de equilíbrio, mas antes da introdução dos peixes de ensaio.

Em quaisquer desses casos é necessário efectuar outras medições durante o ensaio, para se confirmar que as concentrações da exposição e os critérios de qualidade foram respeitados.

O valor do pH não deverá variar mais de uma unidade.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

É possível utilizar três tipos de procedimentos:

Ensaio estático:

Trata-se de um ensaio de toxicidade em que não ocorre qualquer fluxo da solução de ensaio. (As soluções permanecem inalteradas durante o período do ensaio.)

Ensaio semiestático:

Trata-se de um ensaio sem fluxo da solução de ensaio, mas com renovação regular das soluções de ensaio após períodos prolongados (por exemplo, 24 horas).

Ensaio por escoamento:

Trata-se de um ensaio de toxicidade em que a água é renovada constantemente nas câmaras de ensaio, sendo a substância química de ensaio transportada com a água utilizada para renovar o meio de ensaio.

1.6.1. **Reagentes**

1.6.1.1. *Soluções das substâncias de ensaio*

As soluções de reserva com a concentração pretendida são preparadas dissolvendo a substância em água desionizada ou simplesmente em água, de acordo com o ponto 1.6.1.2.

As concentrações escolhidas para o ensaio são preparadas por diluição da solução de reserva. Se se realiza um ensaio com concentrações elevadas, a substância pode ser diluída directamente na água de diluição.

▼B

Normalmente as substâncias apenas deverão ser testadas até ao limite de solubilidade. Para algumas substâncias (por exemplo, substâncias que possuem fraca solubilidade em água, ou com um valor P_{ow} elevado, ou para aquelas que formam dispersões estáveis em vez de uma verdadeira solução em água), é aceitável efectuar a experiência com uma concentração superior ao limite de solubilidade da substância para garantir a obtenção da máxima concentração solúvel/estável. Todavia é importante que essa concentração não perturbe, por qualquer forma, o sistema de ensaio (por exemplo, formação de uma película da substância sobre a superfície da água evitando a sua oxigenação, etc.).

É possível recorrer à dispersão ultra-sónica, a solventes orgânicos, a emulsionantes ou a dispersantes para auxiliar a preparação das soluções de reserva de substâncias com fraca solubilidade na água ou para auxiliar a dispersão dessas substâncias no meio de ensaio. Quando se utilizam essas substâncias auxiliares todas as concentrações de ensaio deverão conter a mesma quantidade de substância auxiliar e dever-se-á expor os peixes de ensaio de controlo adicional a uma concentração da substância auxiliar idêntica à utilizada nas séries de ensaio. A concentração dessas substâncias auxiliares deverá ser mínima e em caso algum deve exceder 100 mg por litro de meio de ensaio.

O ensaio deve ser efectuado sem ajustamento do valor de pH. Se houver sinais evidentes de uma alteração nítida dos valores de pH, é aconselhável repetir o ensaio com ajustamento desses valores e efectuar-se o registo dos resultados. Nesse caso ajustar-se-á o valor do pH da solução de reserva para o valor de pH da água de diluição, salvo se houver razões específicas para não se proceder desse modo. Para satisfazer este objectivo é preferível utilizar HC1 e NaOH. Este ajustamento do valor do pH deverá ser efectuado de tal modo que a concentração da substância de ensaio na solução de reserva não varie significativamente. No caso de ocorrer qualquer reacção química ou precipitação do composto de ensaio, provocada por esse ajustamento, deve descrever-se tal facto.

1.6.1.2. *Água de confinação e de diluição*

Utiliza-se uma fonte de água potável (não contaminada por concentrações potencialmente nocivas de cloro, de metais pesados ou de outras substâncias), água natural de boa qualidade ou água reconstituída (ver apêndice 1). É preferível utilizar águas com uma dureza total compreendida entre 10 e 250 mg de $CaCO_3$ por litro e com um valor de pH compreendido entre 6,0 e 8,5.

1.6.2. **Aparelho**

Todos os aparelhos devem ser feitos com materiais quimicamente inertes.

— sistema de diluição automático (para o ensaio por escoamento),

— medidor de oxigénio,

— equipamento para a determinação da dureza da água,

— aparelho adequado para o controlo de temperatura,

— medidor de pH.

1.6.3. **Peixes de experiência**

Os peixes devem estar em boas condições de saúde e não devem ser portadores de qualquer defeito físico aparente.

▼B

As espécies utilizadas deverão ser seleccionadas tomando como base critérios práticos tais como a sua fácil disponibilidade ao longo do ano, a facilidade da sua manutenção, a conveniência de os submeter a ensaio, a sua sensibilidade relativa às substâncias químicas, e quaisquer factores económicos, biológicos ou ecológicos significativos. Quando se faz a selecção das espécies de peixes deve ter-se presente a necessidade de efectuar um estudo comparando os resultados obtidos com os resultados existentes relativos à harmonização internacional (referência 1).

No apêndice 2 encontra-se uma listagem das espécies de peixes recomendadas para a realização deste ensaio; as espécies preferenciais são o peixe-zebra e a truta-arco-íris.

1.6.3.1. *Confinação*

Preferencialmente os peixes deverão ser provenientes de uma reserva única em que todos possuem a mesma idade e comprimento. Os peixes devem ser confinados durante pelo menos 12 dias nas condições seguintes:

Carga:

apropriada ao sistema (recirculação ou escoamento) e às espécies de peixes;

Água:

ver ponto 1.6.1.2;

Luz:

fotoperíodo diário de 12 a 16 horas;

Concentração do oxigénio dissolvido:

pelo menos 80 % do valor da saturação com ar;

Alimentação:

três vezes por semana ou diariamente, cessando 24 horas antes do início do ensaio.

1.6.3.2. *Mortalidade*

Após um período de ajustamento de 48 horas procede-se ao registo das mortalidades aplicando os critérios seguintes:

— superior a 10 % da população, em sete dias:

rejeição de todo o lote,

— entre 5 % e 10 % da população:

prolonga-se o período de confinação durante mais sete dias.

Se não houver mais mortalidades, o lote é aceitável; caso contrário deve ser rejeitado,

— menos do que 5 % da população:

aceita-se o lote.

1.6.4. **Adaptação**

Os peixes devem ser mantidos, nas condições do ensaio relativas à qualidade da água e à temperatura, durante pelo menos sete dias antes do início deste.

▼B

1.6.5. **Procedimento de ensaio**

Antes do ensaio definitivo pode efectuar-se um ensaio preliminar no sentido de se obter informação sobre as concentrações que devem ser utilizadas no ensaio principal.

Para além das séries de ensaio efectua-se uma experiência de controlo sem a substância de ensaio, e, se for relevante, efectua-se também uma experiência de controlo contendo a substância auxiliar.

Consoante as propriedades físicas e químicas do composto de ensaio, assim será seleccionado um ensaio estático, semiestático ou por escoamento, para satisfazer os critérios de qualidade.

Os peixes são expostos à substância de ensaio conforme a seguir descrito:

— duração: 96 horas,

— número de animais: pelo menos sete para cada concentração,

— tanques: com capacidade adequada em relação à carga recomendada,

— carga: recomenda-se uma carga máxima de 1,0 g por litro para os ensaios estático e semiestático; para os sistemas de escoamento é aceitável uma carga superior,

— concentração de ensaio: utilizar-se-ão pelo menos cinco concentrações afastadas entre si por um factor constante inferior a 2,2, e abrangendo tanto quanto possível o intervalo de mortalidade compreendido entre 0 e 100 %,

— água: ver ponto 1.6.1.2,

— luz: fotoperíodo diário de 12 a 16 horas,

— temperatura: apropriada às espécies (apêndice 2) não variando de ± 1ºC para cada ensaio particular,

— concentração do oxigénio dissolvido: não inferior a 60 % do valor da saturação com ar, para o valor de temperatura seleccionado,

— alimentação: nenhuma.

Os peixes são inspeccionados decorridas as duas a quatro horas iniciais e pelo menos em intervalos de 24 horas. Considera-se que os peixes estão mortos se o toque no pedúnculo caudal não produzir qualquer reacção e se não houver movimentos respiratórios visíveis. Regista-se o número de peixes mortos e faz-se a sua remoção. Regista-se também as anomalias visíveis (por exemplo, perda de equilíbrio, alterações do comportamento natatório, função respiratória, pigmentação, etc.).

Diariamente proceder-se-á à medição dos valores de pH, do oxigénio dissolvido e da temperatura.

Teste-limite

Utilizando o procedimento descrito neste método de ensaio é possível efectuar um teste-limite para a concentração de 100 mg por litro no sentido de se demonstrar que o valor CL_{50} é superior a esta concentração.

Se a natureza da substância for tal que não seja possível obter uma concentração de 100 mg por litro, o teste-limite deverá ser efectuado para um valor de concentração igual à solubilidade da substância (ou igual à concentração máxima que forma uma dispersão estável) no meio utilizado (ver também o ponto 1.6.1.1).

▼B

O teste-limite deverá ser efectuado utilizando sete a dez peixes, utilizando-se o mesmo número nos controlos. (A teoria do binómio estabelece que no caso de se utilizar dez peixes com mortalidade 0, existe um intervalo de confiança de 99,9 % em que o valor CL_{50} é superior à concentração utilizada no teste-limite. Com sete, oito ou nove peixes, a ausência de mortalidade proporciona um intervalo de confiança de pelo menos 99 % em que o valor CL_{50} é superior à concentração utilizada.)

Se houver mortalidade deve efectuar-se um estudo completo. No caso de serem observados efeitos subletais, estes deverão ser registados.

2. **RESULTADOS E AVALIAÇÃO**

Para cada período de observações registadas (24, 48, 72 e 96 horas), traça-se a curva da percentagem de mortalidade para cada período de exposição recomendada em função da concentração utilizando papel logarítmico/probabilidade.

Sempre que possível e para cada momento de observação deve estimar-se o valor CI_{50} e os limites de confiança (p = 0,05), utilizando procedimentos normalizados; esses valores deverão ser aproximados para um ou, no máximo, dois algarismos significativos (exemplos de arredondamento para dois algarismos: de 173,5 para 174; de 0,127 para 0,13; de 1,21 para 1,2).

Nos casos em que o declive da curva de resposta concentração/-percentagem é muito acentuado para permitir o cálculo do valor CL_{50}, considera-se suficiente uma estimativa gráfica deste valor.

No caso de duas concentrações consecutivas, sendo a razão entre elas 2,2, proporcionarem apenas mortalidades de 0 e 100 %, considera-se que esses dois valores são suficientes para indicar o intervalo de localização do valor CL_{5O}.

No caso de se verificar que a estabilidade ou a homogeneidade da substância de ensaio não pode ser mantida, dever-se-á descrever esse facto e é necessário tomar precauções na interpretação dos resultados.

3. **RELATÓRIO**

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

— informação sobre o peixe de ensaio (designação científica, estirpe, fornecedor, qualquer tratamento prévio, dimensões e número utilizado para cada concentração de ensaio),

— fonte da água de diluição e características químicas principais (pH, dureza, temperatura),

— no caso de uma substância de fraca solubilidade aquosa, indicar-se-á o método de preparação das soluções de reserva e de ensaio,

— concentração de quaisquer substâncias auxiliares,

— enumeração das concentrações utilizadas e qualquer informação disponível sobre a estabilidade para essas concentrações da substância química de ensaio, na solução de ensaio,

— no caso de se efectuarem análises químicas, indicar os métodos utilizados e os resultados,

— resultados do teste-limite, se existirem,

— razões para a escolha e pormenores sobre o procedimento de ensaio utilizado (por exemplo, método estático, semiestático, razão entre doses, débito do escoamento, arejamento, número de peixes, etc.),

▼B

— descrição do equipamento de ensaio,

— regime de exposição à luz,

— concentrações do oxigénio dissolvido, valor de pH e temperaturas das soluções de ensaio em cada 24 horas,

— provas demonstrativas de que os critérios de qualidade foram cumpridos,

— um quadro apresentando a mortalidade cumulativa para cada concentração e para o controlo (e, se necessário, para o controlo com a substância auxiliar) em cada um dos momentos de observação recomendados,

— gráfico da curva de resposta concentração/percentagem no fim do ensaio,

— sempre que possível, os valores CL_{50} em cada um dos momentos de observação recomendados (com limites de confiança de 95 %),

— procedimentos estatísticos para a determinação dos valores CL_{50},

— no caso de se utilizar uma substância de referência, os resultados obtidos,

— valor da mais elevada concentração de ensaio que não provoca mortalidade durante o período do ensaio,

— valor da mais fraca concentração que provoca 100 % de mortalidade durante o período do ensaio.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1,/2 and/3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae).* Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow--through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata,* 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökocoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Apêndice 1

Água reconstituída

Exemplo de uma água adequada para diluição

Todas as substâncias químicas devem ser de qualidade analítica.

A água deve ser destilada e de boa qualidade, ou desionizada com uma condutividade inferior a 5 μScm^{-1}.

O aparelho para a destilação da água não deve conter quaisquer partes feitas de cobre.

Soluções de reserva

$CaCl_2$. $2H_2O$ (cloreto de cálcio dihidratado): 11,76 g

Dissolve-se em água e ajusta-se o volume até 1 litro utilizando água.

$MgSO_4$. $7H_2O$ (sulfato de magnésio heptahidratado): 4,93 g

Dissolve-se em água e ajusta-se o volume até 1 litro utilizando água.

$NaHCO_3$ (hidrogenocarbonato de sódio): 2,59 g

Dissolve-se em água e ajusta-se o volume até 1 litro utilizando água.

KCl (cloreto de potássio): 0,23 g

Dissolve-se em água e ajusta-se o volume até 1 litro utilizando água.

Água de diluição reconstituída

Mistura-se 25 ml de cada uma das quatro soluções de reserva e ajusta-se o volume até 1 litro utilizando água.

Faz-se o arejamento até que a concentração do oxigénio dissolvido seja igual ao valor da saturação com ar.

O pH deve ser 7,8 ± 0,2.

Se necessário ajusta-se o valor do pH com NaOH (hidróxido de sódio) ou com HCl (ácido clorídrico).

A água para diluição assim preparada é colocada à parte durante 12 horas e não deve ser mais arejada.

A soma dos iões Ca e Mg nesta solução é de 2,5 mmol por litro. A razão entre os iões Ca:Mg é de 4:1 e entre os iões Na:K é de 10:1. A alcalinidade total desta solução é de 0,8 mmol por litro.

Qualquer desvio na preparação da água de diluição não deve modificar a composição ou as propriedades da água.

▼B

Apêndice 2

Espécies de peixes recomendadas para ensaio

Espécies recomendadas	Intervalo recomendado para as temperaturas de ensaio (ºC)	Comprimento total recomendado para os animais do ensaio (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamil-ton-Buchanan) Peixinho-zebra	20 a 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafi-nesque) Peixinho-cabeça-gorda	20 a 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Carpa	20 a 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliiae) Cyprinodonti-dae (Tomminck et Schlegel 1850) Peixe-arroz-do-Ja-pão	20 a 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Gupi	20 a 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchídae) (Rafinesque Linnaeus 1758) Perca--azul	20 a 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Truta-arco-íris	12 a 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Escalo-prateado	20 a 24	6,0 ± 2,0

Obtenção dos peixes

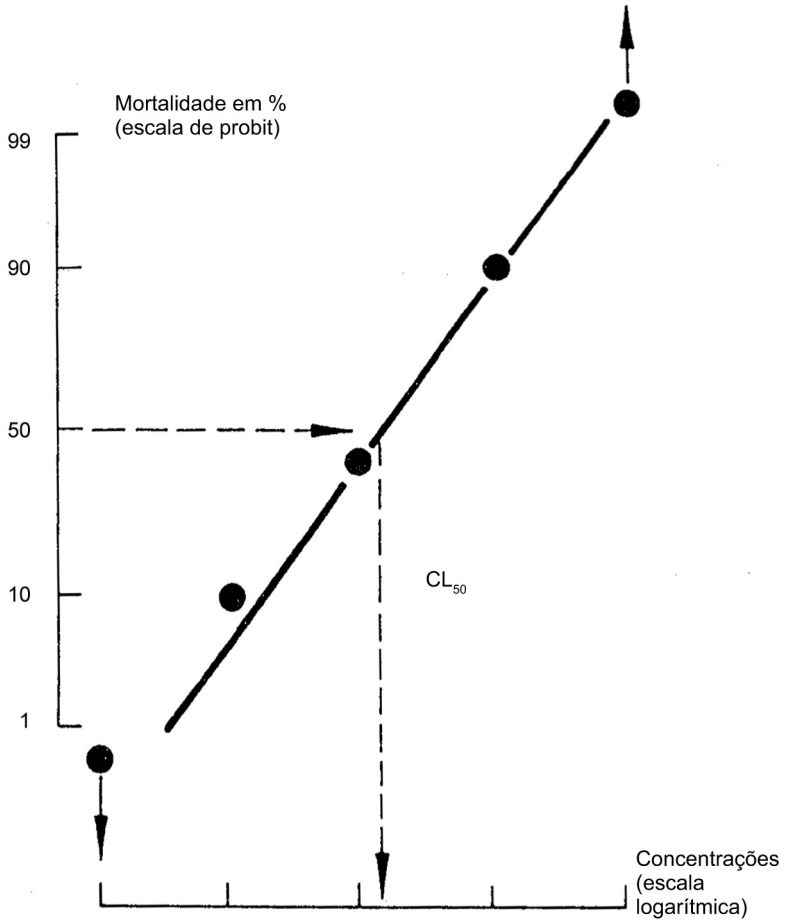
Os peixes acima enumerados são fáceis de criar e amplamente disponíveis ao longo do ano. É fácil criá-los e mantê-los em instalações piscícolas ou em laboratórios, sob condições de controlo de doenças e de parasitas, de tal modo que os animais sejam saudáveis e de origem conhecida. Estes peixes existem em muitas partes do mundo.

▼B

Apêndice 3

Exemplo de concentração: mortalidade percentual

Exemplo da determinação do valor CL_{50} utilizando papel log-probit



▼B

C.2. ENSAIO DE IMOBILIZAÇÃO AGUDA DA *DAPHNIA* SP.

1. MÉTODO

O presente método de ensaio de imobilização aguda é equivalente ao descrito na publicação OECD TG 202 (2004).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método descreve um ensaio de toxicidade aguda para avaliação dos efeitos das substâncias químicas nos dafnídeos. Na medida do possível, foram utilizados métodos de ensaio já existentes (1) (2) (3).

1.2. DEFINIÇÕES

NO ÂMBITO DO PRESENTE MÉTODO, UTILIZAM-SE AS SEGUINTES DEFINIÇÕES:

CE_{50}: estimativa da concentração necessária para imobilizar 50 % dos dafnídeos num dado período de exposição. Caso seja utilizada outra definição, a definição utilizada e a respectiva referência devem ser especificadas.

Imobilização: Os animais incapazes de nadar decorridos 15 segundos, após agitação suave do recipiente de ensaio, são considerados imobilizados.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Dafnídeos jovens, com menos de 24 horas no início do ensaio, são expostos por um período de 48 horas a diferentes concentrações da substância a ensaiar. Decorridas 24 horas e 48 horas, respectivamente, a imobilização é registada e comparada com valores-testemunha. Os resultados são depois analisados para cálculo da CE_{50} às 48h (para as definições, ver ponto 1.2). A determinação da CE_{50} às 24h é facultativa.

1.4. INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA A ENSAIAR

A solubilidade em água e a pressão de vapor da substância a ensaiar deverão ser conhecidas, devendo existir um método analítico fiável para a quantificação da substância nas soluções de ensaio, relativamente ao qual estejam descritos a eficiência de recuperação e o limite de determinação. A fórmula estrutural, o grau de pureza, a estabilidade em água ou a estabilidade à luz, o P_{ow} e os resultados de um ensaio de biodegradabilidade «fácil» da substância a ensaiar constituem informações úteis (ver método C.4).

Nota: Na referência (4) são dadas orientações para o ensaio de substâncias cujas propriedades físico-químicas dificultam o respectivo ensaio.

1.5. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Pode fazer-se a determinação da CE_{50} duma substância de referência, para garantia da fiabilidade das condições de ensaio. Recomendam-se, para este efeito, os tóxicos utilizados em ensaios interlaboratoriais (1) (5) ([1]). Recomenda-se repetir o ensaio das substâncias de referência mensalmente ou, no mínimo, duas vezes por ano.

([1]) De acordo com estes ensaios interlaboratoriais, bem como com a rectificação técnica à norma ISO 6341, a CE_{50} — 24 h do dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) está compreendida entre 0,6 mg/l e 1,7 mg/l.

▼B

1.6. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Um ensaio é considerado válido quando satisfaz os seguintes critérios:

— nos tratamentos-testemunha, incluindo o que contém o agente solubilizante, a proporção de dafnídeos imobilizados não excede 10 %,

— a concentração de oxigénio dissolvido no final do ensaio é > 3 mg/l, tanto nos recipientes das testemunhas como nos dos tratamentos.

Nota: Em relação ao primeiro critério, a proporção de dafnídeos--testemunha imobilizados ou com outros sinais de doença ou distúrbios — por exemplo, alterações da cor ou comportamentos anómalos, tais como retenção à superfície da água — não deve exceder 10 %.

1.7. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.7.1. **Equipamento**

Os recipientes de ensaio, e restante equipamento que entre em contacto com as soluções de ensaio, devem ser exclusivamente de vidro ou outro material quimicamente inerte. Para o ensaio utilizar-se-ão normalmente tubos de ensaio ou copos, que devem ser limpos antes de cada utilização seguindo procedimentos normais de laboratório. Os recipientes de ensaio devem ser tapados mas não vedados, de forma a reduzir a perda de água por evaporação e evitar que entre poeira nas soluções. O ensaio de substâncias voláteis deve ser feito em recipientes completamente cheios e fechados, suficientemente grandes para que o teor de oxigénio não se torne limitante ou demasiado baixo (ver ponto 1.6 e primeiro parágrafo do ponto 1.8.3).

Utilizar-se-á ainda o seguinte equipamento, na totalidade ou em parte: medidor de oxigénio (com microeléctrodo ou outro equipamento adequado para a medição do oxigénio dissolvido em amostras de volume reduzido); medidor de pH; aparelho adequado para o controlo da temperatura; equipamento para a determinação da concentração de carbono orgânico total (COT); equipamento para a determinação da carência química de oxigénio (CQO); equipamento para a determinação da dureza, etc.

1.7.2. **Organismos experimentais**

A espécie preferida é a *Daphnia magna* Straus, embora possam também utilizar-se outras espécies adequadas de *Daphnia* (por exemplo, *Daphnia pulex*). No início do ensaio, os animais devem ter menos de 24 horas de vida; a fim de reduzir a variabilidade, recomenda-se vivamente que não provenham da primeira postura do progenitor. Devem provir de uma população saudável [isto é, não evidenciar sinais de distúrbios, tais como elevada mortalidade, presença de machos e ovos de resistência (*ephippia*), atraso na primeira postura, animais com alterações na cor, etc.]. Todos os organismos utilizados num determinado ensaio devem provir de culturas da mesma população de dafnídeos. Os animais dessa população devem ser mantidos em condições de cultura (luz, temperatura, meio) semelhantes às que irão ser utilizadas no ensaio. Se o meio de cultura a utilizar no ensaio for diferente do normalmente utilizado para a cultura de dafnídeos, é aconselhável prever um período de aclimatação antes do ensaio. Para o efeito, os dafnídeos devem ser mantidos em água de diluição à temperatura do ensaio pelo menos durante as 48 horas anteriores ao início do ensaio.

▼B

1.7.3. **Águas de cultura e de diluição**

Para a cultura e a diluição pode utilizar-se água natural (superficial ou subterrânea), água reconstituída ou água da torneira desclorada, desde que os dafnídeos sobrevivam durante todo o período de cultura, de aclimatação e de ensaio sem evidenciar sinais de distúrbios. Qualquer água conforme às características químicas de uma água de diluição aceitável, enunciadas no apêndice 1, é adequada para o ensaio. A qualidade de água deve ser mantida constante durante o decorrer do ensaio. A água reconstituída pode ser preparada juntando a água desionizada ou destilada quantidades determinadas de reagentes de qualidade analítica reconhecida. Nos documentos indicados nas referências (1) e (6) e no apêndice 2 são dados exemplos de água reconstituída. Saliente-se que os meios contendo quelantes conhecidos, tais como os meios M4 e M7 do apêndice 2, devem ser evitados no ensaio de substâncias que contenham metais. O pH deve estar compreendido no intervalo de 6 a 9. Recomenda-se uma dureza compreendida entre 140 e 250 mg/l (expressa em $CaCO_3$), para a *Daphnia magna,* ao passo que para outras espécies de *Daphnia* podem ser também adequadas durezas menores. A água de diluição pode ser arejada antes da utilização no ensaio, de forma a que a concentração de oxigénio dissolvido atinja a saturação.

Se for utilizada água natural, os parâmetros de qualidade devem ser medidos pelo menos duas vezes por ano, ou sempre que haja suspeita de que as características indicadas (ver parágrafos anteriores e apêndice 1) possam ter variado de modo significativo. Deve também determinar-se o teor de metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, etc.). Se for utilizada água da torneira desclorada, é aconselhável determinar diariamente o teor de cloro. Se a água de diluição provier de um manancial subterrâneo ou superficial, devem ser determinados a condutividade e o carbono orgânico total (COT) ou a carência química de oxigénio (CQO).

1.7.4. **Soluções de ensaio**

De um modo geral, as soluções de ensaio com as concentrações escolhidas são preparadas por diluição de uma solução-padrão. As soluções-padrão devem ser preparadas, de preferência, por dissolução da substância a ensaiar na água de diluição. Deve evitar-se, tanto quanto possível, a utilização de solventes, emulsionantes ou dispersantes. No entanto, tais compostos podem ser necessários, em alguns casos, para produzir uma solução-padrão com a concentração adequada. O documento indicado na referência (4) contém orientações quanto aos solventes, emulsionantes e dispersantes mais adequados. Em qualquer dos casos, o teor de substância ensaiada presente nas soluções de ensaio nunca deve exceder o limite de solubilidade na água de diluição.

O ensaio deve ser efectuado sem ajustamento do pH. Se o pH não se mantiver no intervalo de 6 a 9 será efectuado outro ensaio, ajustando o pH da solução-padrão ao da água de diluição antes da adição da substância a ensaiar. O ajustamento do pH deve ser efectuado de modo a não provocar alteração significativa da concentração da solução-padrão, nem causar qualquer reacção química ou precipitação da substância ensaiada. Devem utilizar-se, de preferência, HCl e NaOH.

▼B

1.8. PROCEDIMENTO

1.8.1. **Condições de exposição**

1.8.1.1. *Grupos tratados e grupos-testemunha*

Encher os recipientes de ensaio com volumes adequados de água de diluição e de soluções da substância a ensaiar. A relação ar/água, em volume, deve ser a mesma nos recipientes dos grupos tratados e dos grupos-testemunha. Colocar, em seguida, os dafnídeos nos recipientes de ensaio. Para cada concentração ensaiada e para os grupos-testemunha devem ser utilizados pelo menos 20 animais, de preferência divididos em quatro grupos de cinco animais. Deve haver um volume de pelo menos 2 ml de solução de ensaio por animal (ou seja, um volume de 10 ml para cinco dafnídeos por recipiente). O ensaio pode ser realizado utilizando o sistema de renovação semiestático ou, quando a concentração da substância ensaiada não for estável, o sistema de escoamento.

A par da série de tratamentos, deve ser realizada uma série-testemunha com água de diluição e, se aplicável, uma série-testemunha com o agente de solubilização.

1.8.1.2. *Concentrações ensaiadas*

Pode ser realizado um ensaio prévio para determinação da gama de concentrações a utilizar no ensaio propriamente dito, excepto nos casos em que existam informações quanto à toxicidade da substância a ensaiar. Para o efeito, os dafnídeos devem ser expostos a concentrações da substância a ensaiar bastante espaçadas entre si. Devem ser expostos a cada concentração ensaiada cinco dafnídeos, durante 48 horas ou menos, não sendo necessárias repetições. O período de exposição pode ser encurtado (por exemplo, 24 horas ou menos) se for possível obter em menos tempo as informações necessárias à determinação da gama de concentrações a utilizar.

Devem ser ensaiadas pelo menos cinco concentrações, numa progressão geométrica cuja razão não deve, de preferência, ser superior a 2,2. Deve fornecer-se uma justificação quando se utilizem menos de cinco concentrações. De preferência, a concentração máxima deveria resultar em 100 % de imobilização e a concentração mínima não ter efeitos observáveis.

1.8.1.3. *Condições de incubação*

A temperatura deve estar compreendida no intervalo de 18ºC a 22ºC, não devendo a variação em cada ensaio exceder ± 1ºC. Recomenda-se um ciclo de 16 horas de luz e 8 horas de escuridão. Pode também optar-se pela escuridão completa, sobretudo se a substância ensaiada for instável à luz.

Os recipientes não devem ser arejados durante o ensaio. O ensaio é efectuado sem ajustamento do pH. Os dafnídeos não devem ser alimentados durante o ensaio.

1.8.1.4. *Duração*

A duração do ensaio é de 48 horas.

1.8.2. **Observações**

24 horas e 48 horas após o início do ensaio, os recipientes devem ser observados para contagem dos dafnídeos imobilizados (ver definições no ponto 1.2). Além da imobilização, deve ser registado também qualquer comportamento ou aspecto anómalo.

▼B

1.8.3. **Determinações analíticas**

O oxigénio dissolvido e o pH são determinados no início e no fim do ensaio, nas testemunhas e no tratamento com maior concentração de substância ensaiada. A concentração de oxigénio dissolvido nos recipientes dos grupos-testemunha deve estar em conformidade com o critério de validade (ver ponto 1.6). A variação do pH em cada ensaio não deve, normalmente, exceder 1,5 unidades. A temperatura é normalmente medida nos recipientes-testemunha ou no ar ambiente, devendo, de preferência, ser registada continuamente durante o ensaio ou, no mínimo, no início e no fim do mesmo.

A concentração de substância ensaiada deve ser medida, no mínimo, nos tratamentos com maior e menor concentração, no início e no fim do ensaio (4). Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. No entanto, caso seja possível demonstrar que a concentração da substância a ensaiar na solução se manteve, durante o ensaio, no intervalo de ± 20 % do valor nominal ou do valor da concentração inicial medida, os resultados poderão basear-se em valores nominais ou nos valores iniciais medidos.

1.9. ENSAIO-LIMITE

Pode ser efectuado, utilizando os procedimentos descritos no presente método, um ensaio-limite com uma concentração de 100 mg/l da substância a ensaiar, ou até ao respectivo limite de solubilidade no meio de ensaio, se este for inferior, a fim de demonstrar que a CE_{50} é superior àquela concentração. O ensaio-limite deve ser efectuado com 20 dafnídeos (de preferência, divididos em quatro grupos de cinco), utilizando-se o mesmo número nos grupos-testemunha. Se houver alguma ocorrência de imobilização, deverá realizar-se um estudo completo. Qualquer comportamento anómalo deve ser registado.

2. **DADOS**

Os dados devem ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo de tratamento e cada grupo-testemunha, o número de dafnídeos usados e a imobilização em cada momento de observação. As percentagens de imobilizados registadas às 24 horas e às 48 horas são depois representadas num gráfico, em função das concentrações ensaiadas. Os dados são em seguida analisados por métodos estatísticos adequados (por exemplo, análise probit, etc.) para cálculo dos coeficientes angulares e da CE_{50}, com um intervalo de confiança de 95 % (p = 0,05) (7) (8).

Quando não sejam aplicáveis aos dados obtidos os métodos usuais de cálculo da CE_{50}, a maior concentração que não provoque imobilização e a menor concentração que provoque 100 % de imobilização devem ser usadas como valores aproximados para o cálculo da CE_{50}, que será considerada como sendo a média geométrica daquelas duas concentrações.

3. **RELATÓRIOS**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir o seguinte:

Substância ensaiada:

— natureza física e propriedades físico-químicas relevantes,

▼B

— dados relativos à identificação química, incluindo a pureza.

Espécie experimental:

— espécie de *Daphnia* utilizada e sua origem, fornecedor original (se for conhecido) e condições de cultura utilizadas (incluindo a origem, tipo e quantidade de alimentos e a frequência com que são fornecidos).

Condições experimentais:

— descrição dos recipientes de ensaio: tipo de recipiente, volume de solução, número de dafnídeos por recipiente, número de recipientes (repetições) por concentração,

— métodos de preparação das soluções-padrão e das soluções de ensaio, incluindo a utilização de solventes ou dispersantes, concentrações utilizadas,

— informações respeitantes à água de diluição: origem e parâmetros de qualidade (pH, dureza, razão Ca/Mg, razão Na/K, alcalinidade, condutividade, etc.); composição da água reconstituída, caso tenha sido utilizada,

— condições de incubação: temperatura, intensidade e periodicidade da iluminação, oxigénio dissolvido, pH, etc.

Resultados:

— número e percentagem de dafnídeos imobilizados ou nos quais foram detectados efeitos nocivos (incluindo anomalias de comportamento) nos grupos-testemunha e em cada um dos grupos tratados, em cada uma das observações efectuadas, bem como uma descrição da natureza dos efeitos observados,

— resultados e data do ensaio da substância de referência, caso existam,

— concentrações nominais ensaiadas e resultado de todas as análises efectuadas para determinação da concentração da substância ensaiada nos recipientes de ensaio; devem também ser indicados a eficiência de recuperação do método e o limite de determinação,

— todas as medições físico-químicas da temperatura, do pH e do oxigénio dissolvido efectuadas durante o ensaio,

— o valor da CE_{50} de imobilização às 48 h, com intervalos de confiança e gráficos do modelo ajustado utilizados no respectivo cálculo, os coeficientes angulares das linhas dose/resposta e respectivo desvio-padrão, os métodos estatísticos utilizados na determinação da CE_{50} (os mesmos dados devem também ser indicados para a imobilização às 24 h, se tiverem sido medidos),

— explicação dos eventuais desvios relativamente ao «Método de ensaio», e da medida em que afectaram os resultados do ensaio.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) ISO 6341. (1996). Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test. Third edition, 1996.

(2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

(3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

(4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris, 2000.

(5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

(6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

(7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials. Pp 65-84

(8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

Apêndice 1

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

Substância	Concentração
Partículas em suspensão	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amoníaco (não ionizado)	< 1 µg/l
Cloro residual	< 10 µg/l
Total de pesticidas organofosforados	< 50 ng/l
Total de pesticidas organoclorados + bifenilos policlorados	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

▼B

Apêndice 2

EXEMPLOS DE ÁGUA RECONSTITUÍDA ADEQUADA PARA O ENSAIO

Água de ensaio ISO (1)

Soluções-padrão (uma só substância)		Para preparar a água reconstituída, juntar a 1 litro de água os seguintes volumes de soluções-padrão (*)
Substância	Quantidade adicionada a 1 litro de água (*)	
Cloreto de cálcio $CaCl_2\ 2H_2O$	11,76 g	25 ml
Sulfato de magnésio $MgSO_4\ 7H_2O$	4,93 g	25 ml
Bicarbonato de sódio $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Cloreto de potássio KCl	0,23 g	25 ml

(*) Água de pureza adequada, por exemplo, desionizada, destilada ou tratada por osmose inversa, de preferência com condutividade não superior a 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Meios Elendt M7 e M4

Aclimatação aos meios Elendt M4 e M7

Alguns laboratórios tiveram dificuldades na transferência directa de *Daphnia* para os meios M4 e M7. No entanto, obteve-se algum sucesso com uma aclimatação gradual, isto é, transferindo do meio próprio para meio Elendt a 30 %, a 60 % e, por fim, a 100 %. Os períodos de aclimatação necessários podem atingir um mês.

Preparação

Oligoelementos

Preparar separadamente soluções-padrão (I) de cada oligoelemento em água de pureza adequada, por exemplo, desionizada, destilada ou tratada por osmose inversa. Com estas soluções-padrão (I), preparar uma segunda solução-padrão única (II) contendo todos os oligoelementos (solução combinada), ou seja:

Solução(ões)-padrão I (uma só substância)	Quantidade adicionada à água (mg/l)	Concentração (em relação ao meio M4)	Para preparar a solução-padrão combinada II, juntar a seguinte quantidade de soluçãopadrão I à água (ml/l)	
			M4	M7
$H_3\ BO_3$	57 190	20 000 vezes	1,0	0,25
$MnCl_2\ 4H_2O$	7 210	20 000 vezes	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 vezes	1,0	0,25

▼B

Solução(ões)-padrão I (uma só substância)	Quantidade adicionada à água (mg/l)	Concentração (em relação ao meio M4)	Para preparar a solução-padrão combinada II, juntar a seguinte quantidade de soluçãopadrão I à água (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000 vezes	1,0	0,25
$SrCl_2$ $6H_2O$	3 040	20 000 vezes	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 vezes	1,0	0,25
Na_2 MoO_4 $2H_2O$	1 230	20 000 vezes	1,0	0,25
$CuCl_2$ $2H_2O$	335	20 000 vezes	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 vezes	1,0	1,0
$CoCl_2$ $6H_2O$	200	20 000 vezes	1,0	1,0
KI	65	20 000 vezes	1,0	1,0
Na_2 SeO_3	43,8	20 000 vezes	1,0	1,0
NH_4 VO_3	11,5	20 000 vezes	1,0	1,0
Na_2 EDTA $2H_2O$	5 000	2 000 vezes	—	—
$FeSO_4$ $7H_2O$	1 991	2 000 vezes	—	—

As soluções Na_2 EDTA e $FeSO_4$ são preparadas separadamente, depois vertidas no mesmo recipiente e imediatamente esterilizadas em autoclave,

obtendo-se assim:

21 de solução Fe-EDTA		1 000 vezes	20,0	5,0

Meios M4 e M7

Os meios M4 e M7 são preparados a partir da solução-padrão II, dos macronutrientes e das vitaminas, do seguinte modo:

	Quantidade adicionada à água (mg/l)	Concentração (em relação ao meio M4)	Quantidade de solução II adicionada para preparação do meio (ml/l)	
			M4	M7
Solução-padrão II (combinação de oligoelementos)		20 vezes	50	50
Soluções-padrão de macronutrientes (uma só substância)				
$CaCl_2 \cdot 2H_20$	293 800	1 000 vezes	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000 vezes	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 vezes	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 vezes	1,0	1,0
Na_2 $SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000 vezes	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 vezes	0,1	0,1
KH_2 PO_4	1 430	10 000 vezes	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 vezes	0,1	0,1

▼B

	Quantidade adicionada à água (mg/l)	Concentração (em relação ao meio M4)	Quantidade de solução II adicionada para preparação do meio (ml/l)	
			M4	M7
Solução-padrão de vitaminas	—	10 000 vezes	0,1	0,1
A solução-padrão de vitaminas prepara-se juntando as três vitaminas a 1 litro de água conforme indicado a seguir:				
Cloridrato de tiamina	750	10 000 vezes		
Cianocobalamina (B_{12})	10	10 000 vezes		
Biotina	7,5	10 000 vezes		

A solução-padrão de vitaminas é armazenada e congelada em pequenas alíquotas. As vitaminas são adicionadas ao meio imediatamente antes da utilização.

N.B.: Para evitar a precipitação dos sais quando se prepara o meio completo, adicionar as alíquotas de soluções de reserva a cerca de 500-800 ml de água desionizada e perfazer até 1 l.

N.B: A primeira publicação relativa ao meio M4 tem a seguinte referência: Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M1

C.3. CIANOBACTÉRIAS E ALGAS DE ÁGUA DOCE, ENSAIO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO

1. MÉTODO

Este método é equivalente ao OECD TG 201 (Orientação de ensaio 201 da OCDE, 2006) (1).

1.1. INTRODUÇÃO

Os métodos de ensaio são revistos e actualizados periodicamente à luz dos progressos científicos. O método de ensaio C.3 precisava de ser revisto a fim de incluir mais espécies e de garantir o cumprimento das exigências em matéria de avaliação de riscos e de classificação dos produtos químicos. A revisão foi concluída com base na extensa experiência prática, nos progressos científicos no domínio dos estudos de toxicidade com algas e na extensa utilização no domínio regulamentar desde a adopção do método original.

1.2. DEFINIÇÔES

Para efeitos do presente método de ensaio, foram utilizadas as seguintes definições e abreviaturas:

Biomassa: peso seco de matéria viva presente numa população, expresso por unidade de volume; ou seja, mg de algas/litro de solução de ensaio. Normalmente, a «biomassa» é definida como uma massa, mas no presente ensaio o termo é utilizado em relação à massa por unidade de volume. Ainda no presente ensaio, alguns valores alternativos de biomassa, como as contagens de células, a fluorescência, etc., são normalmente medidos, sendo o termo «biomassa» utilizado também para essas medições alternativas.

Coeficiente de variação: é uma medida adimensional da variabilidade de um parâmetro, definida como a relação entre o desvio-padrão e a média. Esta medida pode igualmente ser expressa em termos de percentagem. O coeficiente de variação médio da taxa de crescimento específica média em culturas de controlo replicadas deve ser calculado do seguinte modo:

1. Calcular o CV, em percentagem, da taxa média de crescimento específico de cada replicado a partir das taxas de crescimento diárias/em cada secção do ensaio.

2. Calcular o valor médio de todos os valores calculados de acordo com o ponto 1, a fim de obter o coeficiente de variação médio das taxas de crescimento específico diárias/em cada secção do ensaio dos replicados das culturas de controlo.

EC_x: é a concentração da substância em estudo que, dissolvida no meio de ensaio, resulta numa redução de x % (p. ex.: 50 %) do crescimento do organismo de ensaio, após um determinado período de exposição (que deverá ser explicitamente mencionado nos casos em que se afaste da duração total ou normal do ensaio). A fim de indicar de forma inequívoca se o valor de EC se refere à taxa de crescimento ou ao rendimento, serão utilizados, respectivamente, os símbolos «E_rC» e «E_yC».

Meio de crescimento: é o meio de cultura sintético completo em que as algas de ensaio são cultivadas quando expostas à substância em estudo. A substância em estudo será normalmente dissolvida no meio de ensaio.

Taxa de crescimento (taxa média de crescimento específico): é o aumento logarítmico da biomassa durante o período de exposição.

▼M1

Menor concentração com efeito observável (LOEC): é a concentração mais baixa à qual se observa que a substância em estudo tem um efeito estatisticamente significativo (para $p < 0,05$) de redução do crescimento, quando comparada com o controlo, para um determinado período de exposição. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior ao verificado com a LOEC. Quando estas duas condições não estiverem satisfeitas, deverá ser fornecida uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, consequentemente, a NOEC).

Concentração sem efeitos observáveis (NOEC): é a concentração de ensaio imediatamente inferior à LOEC.

Variável de resposta: é uma variável de estimação da toxicidade, derivada de qualquer dos parâmetros medidos que descrevem a biomassa nos diferentes métodos de cálculo. No caso do presente método, as taxas de crescimento e os rendimentos são variáveis de resposta derivadas da medição directa da biomassa ou de qualquer dos métodos alternativos mencionados.

Taxa de crescimento específico: é uma variável de resposta definida como o quociente da diferença entre os logaritmos naturais de um parâmetro de observação (no presente método, a biomassa) e o respectivo período.

Rendimento: é o valor de uma variável de medição no final do período de exposição menos o valor da variável de medição no início do período de exposição, que exprime o aumento da biomassa durante o ensaio.

1.3. APLICABILIDADE DO ENSAIO

O presente método de ensaio será de aplicação mais fácil para substâncias hidrossolúveis que, nas condições de ensaio, permaneçam em solução na água. Para o ensaio de substâncias voláteis, fortemente adsorventes, coradas, com baixa hidrossolubilidade ou que possam afectar a disponibilidade de nutrientes ou de minerais no meio de ensaio, poderá ser necessário proceder a algumas alterações do procedimento descrito (p. ex.: utilização de sistemas fechados, condicionamento dos recipientes de ensaio). Para mais orientações sobre algumas alterações adequadas, consultar as referências bibliográficas (2), (3) e (4).

1.4. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O objectivo do presente ensaio é determinar os efeitos de uma substância sobre o crescimento de cianobactérias e/ou algas de água doce. Os organismos de ensaio em fase de crescimento exponencial são expostos à substância em estudo em culturas em meio líquido, normalmente durante 72 horas. Apesar da duração relativamente curta do ensaio, podem avaliar-se os efeitos ao longo de diversas gerações.

A resposta do sistema consiste na redução do crescimento numa série de culturas de algas (unidades de ensaio) expostas a diferentes concentrações da substância em estudo. Essa resposta é avaliada em função da concentração de exposição, por comparação com o crescimento médio de culturas de controlo replicadas e não expostas à substância em estudo. A fim de obter uma caracterização total da resposta do sistema aos efeitos tóxicos (optimização da sensibilidade), permite-se o crescimento exponencial não limitado das culturas, com uma quantidade suficiente de nutrientes e em condições de iluminação constante, durante um período suficiente para que se possa medir a redução da taxa de crescimento específica.

▼M1

O crescimento, bem como a respectiva inibição, é quantificado através da medição da biomassa das algas ao longo do tempo. A biomassa das algas é definida como o peso seco por unidade de volume, ou seja, ml de algas/litro de solução de ensaio. A determinação do peso seco é, contudo, difícil, pelo que se utilizam parâmetros alternativos. Entre esses, o mais utilizado é a contagem de células. Outros parâmetros alternativos incluem o volume de células, a fluorescência, a densidade óptica, etc. Deve ser conhecido um factor de conversão entre o parâmetro alternativo medido e a biomassa.

O ponto final do ensaio ocorre quando se dá inibição do crescimento, expresso como o aumento logarítmico da biomassa (taxa média de crescimento específico) durante o período de exposição. A partir das taxas médias de crescimento específico registadas numa série de soluções de ensaio, a concentração que causa uma inibição da taxa de crescimento de x % (p. ex.: 50 %) é determinada e expressa como E_rC_x (nesse caso, E_rC_{50}).

Para efeitos da aplicação do presente método no âmbito do quadro regulamentar da UE, o cálculo dos resultados deverá basear-se numa taxa média de crescimento específico, pelos motivos abaixo expostos, no ponto 2.2. Uma variável de resposta adicional utilizada no presente método de ensaio é o rendimento, que pode ser necessário para dar cumprimento a exigências regulamentares específicas de alguns países. Essa variável é definida como a biomassa no final do período de exposição menos a biomassa no início do mesmo período. A partir do rendimento registado numa série de soluções de ensaio, a concentração que causa uma inibição do rendimento de x % (p. ex.: 50 %) é determinada e expressa como E_yC_x (nesse caso, E_yC_{50}).

Por outro lado, a menor concentração com efeito observável (LOEC) e a concentração sem efeitos observáveis (NOEC) podem ser determinadas estatisticamente.

1.5. INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

A informação sobre a substância em estudo que poderá ser útil para estabelecer as condições do ensaio inclui a sua fórmula estrutural, pureza, estabilidade à luz, estabilidade nas condições de ensaio, propriedades de absorção da luz, pKa e os resultados dos estudos de transformação, incluindo a biodegradabilidade na água.

A hidrossolubilidade, o coeficiente de partição octanol/água (P_{ow}) e a pressão de vapor da substância em estudo deverão ser conhecidos, devendo estar disponível um método validado para a quantificação da substância nas soluções de ensaio com uma eficiência de recuperação e um limite de detecção conhecidos.

1.6. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Para verificação do procedimento de ensaio, pode(m) ser ensaiada(s) (uma) substância(s) de referência, como por exemplo o 3,5-diclorofenol, utilizado na prova internacional do anel (4). O dicromato de potássio pode também ser utilizado como substância de referência para as algas verdes. Será desejável proceder ao ensaio de uma substância de referência pelo menos duas vezes por ano.

1.7. VALIDADE DO ENSAIO

Um ensaio é considerado válido quando satisfaz os seguintes critérios de desempenho:

▼M1

— A biomassa das culturas de controlo deve ter aumentado exponencialmente num factor de pelo menos 16 durante as 72 horas do período de ensaio. Esse valor corresponde a uma taxa de crescimento específica de 0,92 dia^{-1}. A taxa de crescimento das espécies mais frequentemente utilizadas é geralmente muito mais elevada (ver o apêndice 1). Este critério não poderá ser cumprido quando se utilizarem espécies de crescimento mais lento do que as espécies que constam do apêndice 1. Nesses casos, o período de ensaio deverá ser alargado para permitir um factor de crescimento mínimo de 16 nas culturas de controlo, devendo esse crescimento ser exponencial durante todo o período de ensaio. O período de ensaio poderá ser reduzido até ao mínimo de 48 horas, de modo a manter um crescimento exponencial não limitado durante todo o período de ensaio, desde que o factor mínimo de multiplicação por 16 seja atingido,

— O coeficiente médio de variação das taxas de crescimento específico em cada secção do ensaio (dias 0-1, 1-2 e 2-3, no caso dos ensaios de 72 horas) nas culturas de controlo (ver no ponto 1.2 a definição de «coeficiente de variação») não deve exceder os 35 %. No que respeita ao cálculo das taxas de crescimento específico em cada secção do ensaio, ver o segundo parágrafo do ponto 2.2.1. Este critério é aplicável ao valor médio dos coeficientes de variação calculados para os replicados das culturas de controlo,

— O coeficiente de variação das taxas médias de crescimento específico dos replicados das culturas de ensaio, durante todo o período de ensaio, não deve exceder 7 % nos ensaios com *Pseudokirchneriella subcapitata* e com *Desmodesmus subspicatus*. Em relação a outras espécies menos utilizadas, esse valor não deve exceder os 10 %.

1.8. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.8.1. **Equipamento**

Os recipientes de ensaio e outros equipamentos que entrem em contacto com as soluções de ensaio devem ser totalmente construídos em vidro ou noutro material quimicamente inerte. Todo o material deve ser cuidadosamente lavado, de forma a garantir que nenhum contaminante orgânico ou inorgânico possa interferir com o crescimento das algas ou com a composição das soluções de ensaio.

Os recipientes de ensaio serão normalmente frascos de vidro dimensionados de forma a permitir a recolha dos volumes de cultura necessários para as medições ao longo do ensaio e a garantir uma superfície de contacto suficiente para a permuta de CO_2 com a atmosfera (ver o segundo parágrafo do ponto 1.8.9). De notar que o volume de líquido deve ser suficiente para as necessárias determinações analíticas (ver o quinto parágrafo do ponto 1.8.11).

Adicionalmente, será necessário o seguinte equipamento:

— Aparelho de cultura: recomenda-se a utilização de um armário ou câmara onde a temperatura de incubação escolhida possa ser mantida com uma precisão de ± 2 °C,

— Instrumentos de medição da luz: é importante notar que o método escolhido para a medição da intensidade luminosa e, em especial, o tipo de receptor (colector) terá influência sobre o valor medido. As medições deverão ser feitas, de preferência, utilizando um receptor esférico (4 π, que responda à luz directa e à luz reflectida a partir de todos os ângulos acima e abaixo do plano de medição) ou um receptor 2 π (que responda à luz proveniente de todos os ângulos acima do plano de medição),

▼M1

— Aparelho para determinação da biomassa das algas: A contagem de células, que é o parâmetro alternativo mais frequentemente utilizado para a biomassa das algas, poderá ser feita utilizando um contador electrónico de partículas, um microscópio com câmara de contagem ou um citómetro de fluxo. Outros métodos alternativos possíveis são a medição com um citómetro de massa, com um fluorímetro, com um espectrofotómetro ou com um colorímetro. Será conveniente calcular um factor de conversão que relacione a contagem de células com o peso seco. A fim de conseguir medições úteis para as baixas concentrações de biomassa, quando se utilize um espectrofotómetro poderá ser necessário utilizar células com um percurso óptico mínimo de 4 cm.

1.8.2. **Organismos de ensaio**

Podem ser utilizadas diversas espécies de cianobactérias e de microalgas de água livre. As estirpes que constam da lista do apêndice 1 mostraram-se apropriadas para utilização no procedimento especificado no presente método de ensaio.

Se forem utilizadas outras espécies, deverá ser comunicada a respectiva estirpe e/ou origem. É necessário confirmar que o crescimento exponencial das algas seleccionadas para o ensaio pode ser mantido ao longo de todo o período de ensaio, nas condições vigentes.

1.8.3. **Meio de crescimento**

São recomendados dois meios de crescimento alternativo, o meio OCDE e o meio AAP. As composições desses meios são apresentadas no apêndice 2. De notar que o valor inicial de pH e a capacidade tampão (regulação do aumento do pH) dos dois meios são diferentes. Logo, os resultados dos ensaios poderão ser diferentes em função do meio utilizado, em especial quando estiverem em estudo substâncias ionizantes.

Poderá ser necessário modificar o meio de crescimento para determinados efeitos, como por exemplo quando se pretender proceder ao ensaio de metais ou de agentes quelantes ou quando se pretender proceder a ensaios a diferentes valores de pH. A utilização de um meio modificado deve ser descrita em pormenor e justificada (3)(4).

1.8.4. **Concentração inicial de biomassa**

A biomassa inicial das culturas de ensaio deve ser a mesma em todas as culturas e suficientemente baixa para permitir um crescimento exponencial ao longo de todo o período de incubação, sem risco de esgotamento dos nutrientes. A biomassa inicial não deve ser superior a 0,5 mg/l em peso seco. São recomendadas as seguintes concentrações iniciais de células:

Pseudokirchneriella subcapitata:	5×10^3-10^4	células/ml
Desmodesmus subspicatus	2-5×10^3	células/ml
Navicula pelliculosa	10^4	células/ml
Anabaena flos-aquae	10^4	células/ml
Synechococcus leopoliensis	5×10^4-10^5	células/ml

1.8.5. **Concentrações da substância em estudo**

A gama de concentrações na qual é provável a ocorrência de efeitos pode ser determinada com base nos resultados de ensaios de determinação da gama de concentrações a utilizar. Para o ensaio final e definitivo, devem ser seleccionadas pelo menos cinco concentrações, organizadas numa série geométrica com um factor que não exceda os 3,2. Para as substâncias em estudo que mostrem uma curva de resposta à concentração invariável, poderá justificar-se um factor mais elevado. As séries de concentrações deverão, de preferência, abranger uma gama que cause uma inibição de 5-75 % da taxa de crescimento das algas.

▼M1

1.8.6. **Replicados e controlos**

O ensaio deve ser conduzido com três replicados de cada concentração em estudo. Caso não seja necessário determinar o NOEC, o ensaio poderá ser alterado de modo a aumentar o número de concentrações estudadas, reduzindo o número de replicados por concentração. O controlo deve ter, no mínimo, três replicados e o ideal será utilizar para o controlo o dobro do número de replicados utilizados para cada concentração estudada.

Poderá ser preparado um conjunto separado de soluções de ensaio para as determinações analíticas das concentrações da substância em estudo (ver o quarto e o sexto parágrafos do ponto 1.8.11).

Quando for utilizado um solvente para solubilização da substância em estudo, o ensaio deverá incluir controlos adicionais que contenham esse solvente à mesma concentração usada nas culturas de ensaio.

1.8.7. **Preparação da cultura de inóculo**

Para adaptar as algas às condições de ensaio e garantir que se encontram na fase de crescimento exponencial quando são utilizadas para inocular as soluções em estudo, prepara-se uma cultura de inóculo, em meio de ensaio, 2-4 dias antes do início do mesmo. A biomassa de algas deve ser ajustada de modo a permitir que o inóculo se mantenha em crescimento exponencial até ao início do ensaio. A cultura de inóculo deve ser incubada nas mesmas condições que as culturas de ensaio. O aumento da biomassa da cultura de inóculo será medido, para garantir que o seu crescimento se encontra dentro dos padrões normais para a estirpe de ensaio nas condições de cultura. Um exemplo do procedimento a utilizar para a cultura de algas é apresentado no apêndice 3. Para evitar uma situação de divisões celulares sincronizadas durante o ensaio, poderá ser necessário executar um segundo passo de propagação da cultura de inóculo.

1.8.8. **Preparação das soluções em estudo**

Todas as soluções em estudo devem conter a mesma concentração de meio de crescimento e a mesma biomassa inicial de algas de ensaio. As soluções de ensaio às concentrações escolhidas são normalmente preparadas misturando uma solução de reserva da substância em estudo com meio de crescimento e com a cultura de inóculo. As soluções de reserva são normalmente preparadas por dissolução da substância no meio de ensaio.

Nos casos em que se pretenda adicionar ao meio de ensaio substâncias pouco hidrossolúveis, poderão ser utilizados solventes como a acetona, o álcool t-butílico ou a dimetilformamida (2)(3). A concentração de solvente, que deve ser acrescentado a todas as culturas (incluindo as culturas de controlo) do ensaio à mesma concentração, não deve ultrapassar os 100 μl/l.

1.8.9. **Incubação**

Tapar os frascos de ensaio com rolhas permeáveis ao ar. Os frascos são agitados e colocados no aparelho de incubação. Durante o ensaio, é necessário manter as algas em suspensão e facilitar as transferências de CO_2. Para tal, deve utilizar-se uma agitação ou um movimento constante. As culturas devem ser mantidas a uma temperatura entre os 21 e os 24 °C, controlada com uma precisão de ± 2 °C. Quando forem utilizadas espécies diferentes das que constam da lista do apêndice 1, por exemplo tropicais, poderão ser necessário utilizar temperaturas mais elevadas, desde que sejam cumpridos os critérios de validade. Recomenda-se que os frascos sejam colocados na incubadora de forma aleatória e que a respectiva posição seja mudada diariamente.

▼M1

O pH do meio de controlo não deve aumentar mais do que 1,5 unidades durante o ensaio. Para os metais e compostos que ionizam parcialmente a um pH próximo do pH do ensaio, poderá ser necessário limitar a variação do pH, a fim de obter resultados reprodutíveis e bem definidos. Uma variação inferior a 0,5 unidades de pH é tecnicamente realizável e pode ser conseguida se se garantir uma taxa de transferência mássica de CO_2 da atmosfera para a solução de ensaio, por exemplo aumentando a agitação. Outra hipótese passa pela redução das necessidades de CO_2, reduzindo a biomassa inicial ou a duração do ensaio.

A superfície em que as culturas são incubadas deve receber uma iluminação fluorescente contínua e uniforme, do tipo «branco frio» ou «luz do dia». As diferentes estirpes de algas e cianobactérias têm diferentes necessidades em termos de luz. A intensidade da luz deve, portanto, ser adaptada ao organismo de ensaio utilizado. Para as espécies recomendadas de algas verdes, a intensidade da luz ao nível da solução de ensaio será seleccionada na gama dos 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, medidos na gama de comprimentos de onda necessária para a fotossíntese, entre 400-700 nm, utilizando um receptor adequado. Algumas espécies, em especial a *Anabaena flos-aquae*, crescem bem com menor intensidade de luz, podendo mesmo ser prejudicadas por uma luz demasiado intensa. Para essas espécies, deve ser utilizada intensidade luminosa média de 40-60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (para os instrumentos de medição da luz calibrados em lux, uma gama equivalente a 4 440-8 880 lux para a luz branca corresponde aproximadamente à intensidade luminosa recomendada de 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). A intensidade luminosa não deve variar mais de ± 15 % em relação à intensidade média sobre a zona de incubação.

1.8.10. **Duração do ensaio**

A duração normal dos ensaios é de 72 horas. No entanto, poderão ser efectuados ensaios de maior ou menor duração, desde que estejam cumpridos todos os critérios de validade referidos no ponto 1.7.

1.8.11. **Medições e determinações analíticas**

A biomassa de algas em cada frasco será determinada pelo menos uma vez por dia, ao longo do período de ensaio. Se as medições forem efectuadas em pequenos volumes retirados da solução de ensaio por meio de uma pipeta, esses volumes não devem ser repostos.

A medição da biomassa é efectuada por contagem manual de células num microscópio ou num contador electrónico de partículas (contagem de células e/ou biovolume). Podem ser utilizadas outras técnicas alternativas, como a citometria de fluxo, a fluorescência clorofílica *in vitro* ou *in vivo* (6)(7) ou a densidade óptica, desde que se possa demonstrar uma boa correlação com a biomassa ao longo de toda a gama de concentrações de biomassa prevista durante o ensaio.

O pH das soluções será medido no início e no final do ensaio.

Desde que exista um procedimento analítico para a determinação da substância em estudo na gama de concentrações utilizada, as soluções de ensaio deverão ser analisadas para verificação da concentração inicial e da manutenção da concentração de exposição ao longo do ensaio.

▼M1

A análise da concentração da substância em estudo no início e no final do ensaio, para as concentrações de ensaio mais elevadas e mais baixas e para uma concentração próxima do EC_{50} previsto, poderá ser suficiente quando não for esperada uma variação das concentrações de exposição superior a 20 % em relação ao respectivo valor nominal ao longo do ensaio. Nos casos em que seja improvável que as concentrações se mantenham no intervalo de 80-120 % da concentração nominal, recomenda-se a análise de todas as concentrações de ensaio no início e no final do mesmo. Para as substâncias em estudo voláteis, instáveis ou fortemente adsorventes, recomenda-se a realização de amostragens suplementares para análise a intervalos de 24 horas durante o período de exposição, de modo a caracterizar melhor a diminuição da concentração da substância em estudo. Para essas substâncias, será necessário utilizar um número maior de replicados. Em qualquer dos casos, a determinação das concentrações da substância em estudo só é necessária num dos frascos replicados para cada concentração de ensaio (ou no conteúdo misturado de todos os frascos replicados).

O meio de ensaio preparado especificamente para a análise das concentrações de exposição durante o ensaio deverá ser tratado da mesma forma que o utilizado no ensaio, ou seja, deve ser inoculado com algas e incubado em condições idênticas. Se for necessário analisar a concentração da substância em estudo dissolvida, as algas poderão ter de ser separadas do meio de crescimento. Essa separação deverá, de preferência, ser feita por centrifugação a baixa velocidade, suficiente para garantir a deposição das algas.

Se existirem provas de que a concentração da substância de ensaio não variou mais de 20 %, durante o ensaio, em relação ao valor da concentração nominal ou da concentração inicial medida, a análise dos resultados poderá basear-se nos valores nominais ou iniciais medidos. Se a variação em relação à concentração nominal ou à concentração inicial medida for superior a ± 20 %, a análise dos resultados deverá basear-se na média geométrica da concentração durante a exposição ou em modelos que descrevam a diminuição da concentração da substância em estudo (3)(8).

O ensaio de inibição de crescimento de algas representa um sistema de ensaio mais dinâmico do que a maior parte dos outros tipos de ensaio de toxicidade a curto prazo em meio aquático. Logo, as concentrações reais de exposição poderão ser difíceis de determinar, especialmente para as substâncias mais adsorventes e ensaiadas a concentrações mais baixas. Nesses casos, o desaparecimento da substância da solução, por adsorção à cada vez maior biomassa de algas, não significa que a substância tenha desaparecido do sistema de ensaio. Quando os resultados do ensaio forem analisados, deve verificar-se se a diminuição da concentração da substância em estudo ao longo do mesmo é ou não acompanhada de uma diminuição da inibição do crescimento. Se for esse o caso, poderá ser considerada a possibilidade de utilização de um modelo que descreva a diminuição da concentração da substância em estudo (8). Senão, o melhor poderá ser basear a análise dos resultados nas concentrações iniciais (nominais ou medidas).

1.8.12. **Outras observações**

O inóculo deverá ser observado ao microscópio para verificar se a cultura apresenta um aspecto normal e saudável, tal como as culturas de ensaio, no final do mesmo, para verificar se se observa algum aspecto anormal das algas que possa ser causado pela exposição à substância em estudo.

▼M1

1.8.13. **Ensaio limite**

Em determinadas circunstâncias, ou seja, quando um ensaio preliminar indicar que a substância em estudo não apresenta efeitos tóxicos em concentrações até aos 100 $mg \cdot l^{-1}$ ou até ao limite de solubilidade da substância no meio de ensaio (conforme a que seja menor), poderá proceder-se a um ensaio limite com comparação das respostas de um grupo de controlo e de um grupo exposto à substância em estudo (a uma concentração de 100 $mg \cdot l^{-1}$ ou que corresponda ao limite de solubilidade da substância no meio de ensaio). É fortemente recomendado que se confirme a ausência de toxicidade através da análise da concentração de exposição. Todas as condições de ensaio e critérios de validade anteriormente descritos são aplicáveis aos ensaios limite, com excepção da necessidade de utilizar, no mínimo, seis replicados dos frascos expostos à substância. As variáveis de resposta dos grupos de controlo e de exposição podem ser analisadas através de um ensaio estatístico de comparação das médias, como por exemplo o teste t--Student. Caso as variâncias dos dois grupos sejam diferentes, deverá ser realizado um teste t-Student ajustado para diferenças das variâncias.

1.8.14. **Modificação para substâncias fortemente coradas**

Deve ser utilizada uma irradiação (intensidade luminosa) na parte superior da gama prevista pelo presente método de ensaio: 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ou mais.

O percurso óptico deve ser encurtado, reduzindo o volume das soluções de ensaio (cerca de 5-25 ml).

Deve proceder-se a uma agitação suficiente, por exemplo sacudindo ligeiramente, de modo a obter uma frequência elevada de exposição das algas a altos níveis de irradiação na superfície da cultura.

2. **DADOS**

2.1. APRESENTAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO

A biomassa dos frascos de ensaio pode ser expressa nas unidades do parâmetro alternativo que tenha sido utilizado para as medições (p. ex.: número de células, fluorescência).

Criar tabelas com a concentração estimada da biomassa das culturas de ensaio e dos controlos, em função das concentrações do material em estudo e do momento da amostragem, arredondado às horas, de modo a produzir gráficos das curvas de crescimento. Numa primeira fase poderá ser útil utilizar tanto a escala geométrica como a logarítmica, mas a segunda é obrigatória e resulta geralmente numa melhor representação das variações do padrão de crescimento durante o período de ensaio. De notar que o crescimento exponencial, quando apresentado em escala logarítmica, resulta numa recta cuja inclinação (declive) indica a taxa de crescimento específico.

Utilizando os gráficos, verificar se as culturas de controlo cresceram exponencialmente à taxa prevista ao longo de todo o ensaio. São factores críticos a análise de todos os pontos, do aspecto global dos gráficos e a verificação dos dados brutos e dos procedimentos aplicados, a fim de detectar eventuais erros. Verificar, em particular, qualquer dos pontos que pareça ser afectado por erros sistemáticos. Se se identificarem e/ou forem altamente prováveis erros de procedimento, o ponto em causa será identificado como um ponto aberrante e não deverá ser incluído na análise estatística subsequente (uma concentração de algas igual a zero num dos dois ou três replicados pode indicar que o frasco não foi correctamente inoculado, ou que não estava suficientemente limpo). Os motivos para a rejeição de um ponto considerado como aberrante devem ser claramente indicados no respectivo relatório de ensaio. Os motivos aceites são exclusivamente os (raros) erros de procedimento e não a simples falta de precisão. Os procedimentos estatísticos para a identificação dos pontos aberrantes apresentam uma utilidade limitada para este tipo de problemas, não substituindo nunca a opinião abalizada de um perito. Os pontos aberrantes (assinalados como tal) deverão, de preferência, ser conservados entre os dados apresentados posteriormente em qualquer gráfico ou tabela.

▼M1

2.2. VARIÁVEIS DE RESPOSTA

O objectivo do ensaio é determinar os efeitos da substância em estudo sobre o crescimento das algas. O método de ensaio descreve duas variáveis de resposta, já que os Estados-Membros têm diferentes preferências e necessidades regulamentares. Para que os resultados dos ensaios possam ser aceitáveis em todos os Estados-Membros, os efeitos terão de ser avaliados utilizando ambas as variáveis de resposta, a) e b), a seguir descritas.

a) Taxa média de crescimento específico: esta variável é calculada com base no aumento logarítmico diário da biomassa durante o período de ensaio.

b) Rendimento: a variável de resposta é a biomassa no final do ensaio menos a biomassa no início do mesmo.

Para efeitos da aplicação do presente método no âmbito do quadro regulamentar da UE, o cálculo dos resultados deverá basear-se numa taxa média de crescimento específico, pelos motivos abaixo expostos. Cabe aqui notar que os valores de toxicidade calculados através destas duas variáveis de resposta não são comparáveis e que essa diferença tem de ser reconhecida para efeitos da utilização dos resultados do ensaio. Os valores de EC_x baseados na taxa média de crescimento específico (E_rC_x) serão geralmente mais elevados do que os resultados baseados no rendimento (E_yC_x), se forem seguidas as condições de ensaio apresentadas no presente método de ensaio, devido à base matemática das respectivas abordagens. Esse facto não deve ser interpretado como uma diferença de sensibilidade entre as duas variáveis de resposta, mas simplesmente como uma diferença matemática entre os valores. O conceito de taxa média de crescimento específico baseia-se no padrão geral de crescimento exponencial das algas em culturas não sujeitas a limitações, sendo a toxicidade estimada com base nos efeitos sobre a taxa de crescimento, e não depende do valor absoluto da taxa de crescimento específico dos controlos, do declive da curva de concentração-resposta ou da duração do ensaio. Em contraste, os resultados baseados no rendimento enquanto variável de resposta são dependentes de todas essas variáveis. O valor de E_yC_x é dependente da taxa de crescimento específico da espécie de algas utilizada em cada ensaio e da taxa máxima de crescimento específico, que pode ser diferente para as diferentes espécies ou mesmo para as diferentes estirpes de algas. Esta variável de resposta não deve ser utilizada para comparar a sensibilidade das diferentes espécies ou mesmo das diferentes estirpes de algas aos produtos tóxicos. Embora seja preferível, do ponto de vista científico, utilizar a taxa média de crescimento específico para a estimação da toxicidade, as estimativas da toxicidade com base no rendimento foram também incluídas no presente método de ensaio para satisfazer as actuais exigências regulamentares de alguns países.

2.2.1. **Taxa média de crescimento**

A taxa média de crescimento específico para um determinado período é calculada como o aumento logarítmico da biomassa em cada um dos frascos de controlo e de ensaio, a partir da seguinte equação:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \ (\text{dia}^{-1})$$

onde:

μ_{i-j}: é a taxa média de crescimento específico entre o momento *i* e o momento *j*

X_i: é a biomassa no momento *i*

X_j: é a biomassa no momento *j*

▼M1

Para cada um dos grupos de exposição e de controlo, calcular um valor médio da taxa de crescimento, associado às respectivas estimativas da variância.

Calcular a taxa média de crescimento específico ao longo de todo o ensaio (normalmente nos dias 0-3), utilizando o valor nominal da biomassa inoculada como valor inicial, de preferência à utilização de um valor medido nesse momento, já que dessa forma se consegue geralmente uma precisão mais elevada. Se o equipamento utilizado para a medição da biomassa permitir uma determinação suficientemente precisa dos níveis reduzidos de biomassa presentes após a inoculação (p. ex.: citómetro de fluxo), poderá utilizar-se o valor medido de concentração inicial da biomassa. Verificar igualmente as taxas de crescimento em cada secção do ensaio, calculadas como as taxas de crescimento específico em cada dia do ensaio (dias 0-1, 1-2 e 2-3), verificando se a taxa de crescimento dos controlos se mantém constante (ver os critérios de validade, ponto 1.7). Uma taxa de crescimento específico significativamente mais baixa no primeiro dia do que a taxa média de crescimento específico da totalidade do ensaio pode indicar uma fase de latência. Embora a fase de latência possa ser minimizada ou mesmo praticamente eliminada nas culturas de controlo através de uma propagação adequada da cultura de arranque, essa fase de latência nas culturas expostas à substância em estudo pode indicar uma recuperação após a fase inicial de *stress* por toxicidade ou uma menor exposição à substância em estudo devido ao seu desaparecimento (incluindo a eventual adsorção à biomassa das algas) após a exposição inicial. Logo, a taxa de crescimento em cada secção do ensaio pode ser avaliada para verificar os efeitos da substância em estudo durante o período de exposição. A existência de diferenças substanciais entre as taxas de crescimento de cada secção do ensaio e a taxa média de crescimento indica um desvio em relação à situação de crescimento exponencial constante, exigindo portanto uma análise mais pormenorizada das curvas de crescimento.

Calcular a percentagem de inibição da taxa de crescimento para cada um dos replicados expostos, utilizando a seguinte equação:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

onde:

$\%I_r$: percentagem de inibição da taxa média de crescimento específico

μ_C: valor médio das taxas médias de crescimento específico (μ) no grupo de controlo

μ_T: taxa média de crescimento específico dos replicados do grupo exposto

Quando forem utilizados solventes na preparação das soluções de ensaio, devem utilizar-se para o cálculo da percentagem de inibição os controlos com adição de solvente, em vez dos controlos apenas do meio de cultura.

2.2.2. **Rendimento**

O rendimento é calculado como a biomassa no final do ensaio menos a biomassa inicial, em cada um dos frascos de controlo e de exposição. Para cada uma das concentrações de ensaio e de controlo, calcular um valor médio de rendimento, associado às respectivas estimativas da variância. A percentagem de inibição do rendimento ($\%\ I_y$) pode ser calculada, para cada replicado exposto, do seguinte modo:

$$\%I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

▼**M1**

onde:

$\% I_y$: percentagem de inibição do rendimento

Y_C: valor médio de rendimento no grupo de controlo

Y_T: valor de rendimento para os replicados expostos

2.3. GRÁFICO DA CURVA DE RESPOSTA À CONCENTRAÇÃO

Desenhar o gráfico da percentagem de inibição em função do logaritmo da concentração da substância em estudo e analisar o gráfico cuidadosamente, não entrando em consideração com os pontos que tenham sido identificados como aberrantes na primeira fase. Ajustar uma curva aproximada aos pontos experimentais, à vista ou por interpolação informática, de modo a obter uma primeira impressão da relação de resposta à concentração, após o que se deverá proceder à definição de uma curva mais exacta, de preferência utilizando métodos estatísticos computorizados. Dependendo da utilização que se pretenda dar aos dados, a qualidade (precisão) e a quantidade de dados, bem como a disponibilidade de ferramentas de análise dos mesmos, poderá decidir-se (por vezes, justificadamente) nesta fase não continuar a análise dos dados e limitar as leituras à determinação dos valores-chave EC_{50} e EC_{10} (e/ou EC_{20}) a partir da curva ajustada à vista (ver também o ponto seguinte, em relação aos efeitos de estimulação). Entre as razões válidas para a não utilização de um método estatístico podem referir-se:

— Os dados não permitem obter, a partir de um método computorizado, resultados mais fiáveis do que os que se conseguem obter por opinião abalizada — nessas situações, alguns programas informáticos poderão mesmo ser incapazes de apresentar qualquer solução fiável (iterações divergentes, etc.),

— Os casos em que a respostas é a estimulação do crescimento não são bem descritos pelos programas informáticos disponíveis (ver abaixo).

2.4. PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

O objectivo é descrever de forma quantitativa, por análise de regressão, a relação concentração-resposta. Pode utilizar-se uma regressão linear ponderada, antecedida de uma transformação de linearização dos dados de resposta — por exemplo para unidades *probit*, *logit* ou de Weibull (9), mas a técnica preferida é a aplicação de procedimentos de regressão não linear, que permitem lidar melhor com as inevitáveis irregularidades dos dados e com os desvios em relação a uma boa distribuição. Nas zonas próximas da inibição nula ou total, essas irregularidades podem mesmo ser magnificadas pela transformação, o que irá interferir com a análise (9). Cabe aqui notar que os métodos padrão de análise que utilizam os transformados *probit*, *logit* ou Weibull se destinam à análise de dados quantais (p. ex.: mortalidade e sobrevivência), pelo que terão de ser alterados para lidar com dados de crescimento ou de biomassa. Alguns métodos para a determinação dos valores de EC_x a partir de dados contínuos podem ser consultados em (10), (11) e (12). A utilização da análise de regressão não linear é apresentada com mais pormenor no apêndice 4.

▼M1

Para cada uma das variáveis de resposta em estudo, utilizar a relação concentração-resposta para estimar os valores de EC_x. Sempre que possível, devem ser determinados os limites do intervalo de confiança a 95 %. Para cada estimativa, a adequação do ajustamento da curva estimada pelo modelo de regressão aos dados de resposta deve ser avaliada, graficamente ou por métodos estatísticos. A análise de regressão deve ser efectuada utilizando os valores de cada replicado e não o valor médio para cada grupo exposto. No entanto, se o ajustamento de um gráfico não linear se revelar difícil ou não for possível devido à grande dispersão dos dados, o problema poderá ser contornado pela aplicação da regressão aos valores médios de cada grupo, como forma prática de reduzir a influência dos pontos que sejam provavelmente aberrantes. A utilização desse método deve ser referida no relatório de ensaio como um desvio em relação ao procedimento normal, por não ter sido possível ajustar uma curva aos valores individuais de todos os replicados com bons resultados.

As estimativas do EC_{50} e os respectivos intervalos de confiança podem também ser obtidos utilizando uma interpolação linear com *bootstrapping* (13), quando os modelos/métodos de regressão disponíveis não forem aplicáveis aos dados existentes.

Para a estimação do LOEC e, portanto, do NOEC, bem como dos efeitos da substância em estudo sobre a taxa de crescimento, será necessário analisar as médias dos frascos expostos utilizando técnicas de análise da variância (ANOVA). A média para cada concentração deve então ser comparada com a média observada no controlo, utilizando um método apropriado de comparação múltipla ou de análise das tendências. Os testes de Dunnett ou de Williams (14)(15)(16)-(17)(18) poderão ser úteis para esse efeito. É necessário verificar se está garantida a presunção de homogeneidade da variância das análises ANOVA. Essa verificação poderá ser realizada graficamente ou através de um teste formal (18). Podem ser utilizados os testes de Levene ou de Bartlett. O problema do não cumprimento da presunção de homogeneidade das variâncias pode por vezes ser corrigido através da transformação logarítmica dos dados. Caso a heterogeneidade das variâncias seja extrema e não possa ser corrigida por transformação, deverá ser considerada a possibilidade de utilização de métodos de análise das tendências como por exemplo o método degressivo de Jonkheere. Para mais orientações sobre a determinação do NOEC, consultar a referência (12).

Os mais recentes desenvolvimentos científicos conduziram à recomendação de que fosse abandonado o conceito de NOEC, que deverá ser substituído pela estimação de valores de EC_x por regressão. No caso do presente ensaio com algas, não foi definido nenhum valor ideal para o x. A gama entre 10-20 % parece ser apropriada (dependendo da variável de resposta escolhida), devendo ser comunicados, de preferência, tanto os valores de EC_{10} como de EC_{20}.

2.5. ESTIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO

Por vezes, pode observa-se uma estimulação do crescimento (inibição negativa) a baixas concentrações. Esse fenómeno pode resultar tanto de hormese («estimulação por tóxicos») como da adição de factores estimulantes do crescimento associados ao material em estudo que é adicionado ao meio de reserva. Cabe aqui notar que a adição de nutrientes inorgânicos não deverá, em princípio, ter qualquer efeito directo sobre o ensaio, na medida em que o meio de ensaio deve, de qualquer modo, garantir uma situação de excedente de nutrientes ao longo de todo o ensaio. A estimulação a baixas concentrações pode geralmente ser ignorada para efeitos do cálculo de EC_{50}, a não nos casos em que é extrema. Nesses casos de estimulação extrema, ou quando o valor de x em EC_x é muito baixo, poderá ser necessário utilizar procedimentos especiais. A eliminação pura e simples das respostas de estimulação para efeitos da análise dos dados deve ser evitada sempre que possível e, nos casos em que os programas de ajustamento de curvas aos dados não consigam lidar com as consequências da estimulação a baixas concentrações, pode recorrer-se à interpolação linear com *bootstrapping*. Se a estimulação seja extrema, pode considerar-se a possibilidade de utilizar um modelo de hormese (19).

▼M1

2.6. INIBIÇÃO NÃO TÓXICA DO CRESCIMENTO

Os materiais em estudo que absorvam a luz podem ocasionar uma diminuição da taxa de crescimento por efeito da redução da quantidade de luz disponível. Esse efeitos de tipo físico devem ser calculados de forma independente dos efeitos tóxicos, se necessário alterando as condições do ensaio, e apresentados separadamente. Para mais orientação sobre esta questão, ver as referências (2) e (3).

3. **RELATÓRIOS**

3.1. RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir a seguinte informação:

Substância em estudo:

— natureza física e propriedades físico-químicas relevantes, incluindo o limite de hidrossolubilidade,

— dados relativos à identificação química, incluindo a pureza.

Espécie de ensaio:

— estirpe, fornecedor ou fonte do organismo e condições de cultura utilizadas.

Condições de ensaio:

— data de início do ensaio e respectiva duração,

— descrição do planeamento do ensaio: recipientes de ensaio, volume das culturas, densidade da biomassa no início do ensaio,

— composição do meio,

— concentrações de ensaio e replicados (p. ex.: número de replicados, número de concentrações ensaiadas e progressão geométrica utilizada),

— descrição da preparação das soluções de ensaio, incluindo a eventual utilização de solventes, etc.,

— equipamento de incubação,

— intensidade e qualidade da luz (fonte, homogeneidade),

— temperatura,

— concentrações ensaiadas: concentrações nominais do ensaio e resultados das análises para determinação da concentração da substância em estudo nos frascos de ensaio. Devem ser comunicados a eficácia de recuperação e o limite de quantificação do método na matriz de ensaio,

— todos os desvios em relação ao presente método de ensaio,

— método de determinação da biomassa e provas da correlação entre o parâmetro medido e o peso seco.

Resultados:

— valores do pH no início e no final do ensaio, para todos os frascos expostos,

— biomassa em cada frasco e em cada ponto de medição, bem como o método utilizado para a sua medição,

▼**M1**

— curvas de crescimento (gráficos da biomassa em função do tempo),

— variáveis de resposta calculadas para cada replicado exposto, com os respectivos valores médios, e coeficiente de variação dos replicados,

— representação gráfica da relação concentração/efeito,

— estimativas da toxicidade para as variáveis de resposta, p. ex.: EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, e os intervalos de confiança associados. Quando forem calculados, valores do LOEC e do NOEC e métodos estatísticos utilizados para a respectiva determinação,

— caso tenha sido utilizada uma análise ANOVA, dimensão do efeito detectado (p. ex.:, diferenças menos significativas),

— ocorrência de estimulação do crescimento que tenha sido verificada em qualquer dos grupos expostos,

— qualquer outro efeito observado, como por exemplo a alteração da morfologia das algas,

— discussão dos resultados, incluindo qualquer influência sobre os resultado do ensaio que seja decorrente das alterações efectuadas em relação ao presente método de ensaio.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD TG 201 (2006) Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test

(2) ISO 1998: Water quality — Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442

(3) OCDE 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, n.º 23

(4) ISO 1998: Water quality — Sampling — Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16

(5) ISO 1993: Water quality — Algal growth inhibition test. ISO 8692

(6) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research 31: 2525-2531

(7) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), pp.919-925

(8) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. Environ. Toxicol. Chem 22, 2073-2079

(9) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718

▼**M1**

(10) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167

(11) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11:1485-1494

(12) OCDE. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data

(13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN

(14) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121

(15) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491

(16) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117

(17) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531

(18) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96

▼M1

Apêndice 1

Estirpes que se revelaram adequadas para o ensaio

Algas verdes

— *Pseudokirchneriella subcapitata* (anteriormente designada por *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

— *Desmodesmus subspicatus* (anteriormente designada por *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Diatomáceas

— *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Cianobactérias

— *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

— *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Origem das estirpes

As estirpes recomendadas estão disponíveis sob a forma de culturas puras nas seguintes colecções (por ordem alfabética):

ATCC: American Type Culture Collection

10801 University Boulevard

Manassas, Virginia 20110-2209

EUA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa

Institute of Freshwater Ecology,

Windermere Laboratory

Far Sawrey, Amblerside

Cumbria

LA22 0LP

REINO UNIDO

SAG — Sammlung von Algenkulturen

Albrecht-von-Haller-Institut

Universität Göttingen

Nikloausberger Weg 18

D-37073 Göttingen

ALEMANHA

UTEX Culture Collection of Algae

Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology

School of Biological Sciences

the University of Texas at Austin

Austin, Texas 78712

EUA

▼M1

Aspecto e características das espécies recomendadas

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Aspecto	Células isoladas, curvadas e torcidas	Células ovais, na sua maioria isoladas	Bastonetes	Cadeias de células ovais	Bastonetes
Dimensões (C × L), em µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volume celular (μm^3/célula)	40-60 (1)	60-80 (1)	40-50 (1)	30-40 (1)	2,5 (2)
Peso seco das células (mg/célula)	$2\text{-}3 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$1\text{-}2 \times 10^{-8}$	$2\text{-}3 \times 10^{-9}$
Taxa de crescimento (3) (dia^{-1})	1,5-1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

(1) Medido com um contador electrónico de partículas.
(2) Calculado a partir das dimensões medidas.
(3) Taxa de crescimento mais frequentemente observada em meio OCDE, com incubação a 21 °C com uma intensidade luminosa de aproximadamente 70 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Recomendações específicas quanto à cultura e ao manuseamento das espécies de ensaio recomendadas

Pseudokirchneriella subcapitata e *Desmodesmus subspicatus*

Estas algas verdes são geralmente fáceis de conservar em diferentes meios de cultura. Toda a informação sobre os meios mais adequados está disponível junto das colecções de culturas. As células apresentam-se normalmente isoladas e a sua densidade pode ser facilmente medida utilizando um contador electrónico de partículas ou um microscópio.

Anabaena flos-aquae

Diferentes meios de cultura podem ser utilizados para manter uma cultura de arranque. É particularmente importante evitar que a cultura em meio líquido vá para além da fase de crescimento exponencial, já que a recuperação se torna difícil para lá desse ponto.

A *Anabaena flos-aquae* desenvolve agregados de cadeias de células. A dimensão desses agregados pode variar em função das condições de cultura. Para se poder proceder à contagem de células com um contador electrónico de partículas ou com um microscópio, com vista à determinação da biomassa, poderá ser necessário quebrar esses agregados.

As amostras podem ter de ser divididas em subamostras e tratadas com ultra-sons para quebrar as cadeias e reduzir a variabilidade das contagens. O tratamento com ultra-sons para quebrar as cadeias pode destruir as células se for demasiado prolongado. A intensidade e a duração do tratamento com ultra-sons devem ser idênticos para todas as amostras tratadas.

Contar as células num número suficiente de campos do hemocitómetro (pelo menos 400 células) para compensar a variabilidade. A fiabilidade das determinações através da densidade microscópica será assim maior.

O volume total de *Anabaena* pode ser determinado com um contador electrónico de partículas, depois de quebrar as cadeias de células através de um tratamento cuidadoso com ultra-sons. A energia dos ultra-sons deve ser ajustada de forma a evitar provocar danos nas células.

Utilizar um agitador magnético de rotação ou outro método semelhante que permita garantir que a suspensão de algas utilizada para inocular os frascos de ensaio esteja bem misturada e seja homogénea.

▼M1

Os frascos de ensaio devem ser colocados num agitador orbital ou lateral, a cerca de 150 rotações por minuto. Em alternativa, pode utilizar-se uma agitação intermitente para reduzir a tendência para a criação de agregados da *Anabaena*. Se houver agregação, deve ter-se o cuidado de retirar amostras representativas para as medições de biomassa. Poderá ser necessário agitar vigorosamente os frascos imediatamente antes da mostra, de modo a desfazer os agregados de algas.

Synechococcus leopoliensis

Diferentes meios de cultura podem ser utilizados para manter uma cultura de arranque. Toda a informação sobre os meios mais adequados está disponível junto das colecções de culturas.

A *Synechococcus leopoliensis* apresenta células isoladas, em forma de bastonete. As células são muito pequenas, o que complica a utilização das contagens ao microscópio para a medição da biomassa. Poderá utilizar-se um contador electrónico de partículas equipado para a contagem de partículas com uma dimensão mínima aproximada de 1 μm. Outra possibilidade é medições fluorimétricas *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Podem ser utilizados diferentes meios de cultura para manter uma cultura de arranque. Toda a informação sobre os meios mais adequados está disponível junto das colecções de culturas. De notar que o meio terá de conter silicatos.

A *Navicula pelliculosa* pode, em certas condições de cultura, formar agregados. Uma vez que produzem lípidos, as células têm por vezes tendência a acumularem-se na película superficial. Nessas circunstâncias, terão de se adoptar medidas especiais, aquando da recolha das subamostras para determinação da biomassa, de modo a obter amostras representativas. Poderá ser necessária uma agitação vigorosa, por exemplo com um agitador magnético de rotação.

▼**M1**

Apêndice 2

Meio de cultura

Pode utilizar-se um dos dois meios de cultura seguintes:

Meio OCDE: meio original do método OECD TG 201, norma ISO 8692;

Meio US EPA AAP, norma ASTM.

Para a preparação destes meios, deve utilizar-se reagentes e produtos químicos de qualidade analítica e água desionizada.

Composição do meio AAP (US. EPA) e do meio OECD TG 201

Composto	EPA		OCDE	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2.2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

(*) A relação molar do EDTA para o ferro é ligeiramente superior a 1, o que permite evitar a precipitação do ferro e, simultaneamente, minimizar a quelação dos iões de metais pesados.

Nos ensaios com a diatomácea *Navicula pelliculosa*, ambos os meios devem ser complementados com $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$, na quantidade necessária para obter uma concentração final de 1,4 mg Si/l.

O pH do meio é função do equilíbrio entre o sistema carbonato do meio e a pressão parcial de CO_2 no ar atmosférico. A relação aproximada entre o pH a 25 °C e a concentração molar de bicarbonato é dada por:

$$pH_{eq} = 11{,}30 + \log [HCO_3]$$

▼M1

Com 15 mg/l de $NaHCO_3$, pH_{eq} = 7,5 (meio U.S. EPA) e com 50 mg/l $NaHCO_3$, pH_{eq} = 8,1 (meio OCDE).

Composição elementar dos meios de ensaio

Elemento	EPA	OCDE
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Preparação do meio OCDE

Nutriente	Concentração na solução de reserva
Solução de reserva 1: macronutrientes	
NH_4Cl	1,5 $g \cdot l^{-1}$
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 $g \cdot l^{-1}$
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 $g \cdot l^{-1}$
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 $g \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	0,16 $g \cdot l^{-1}$
Solução de reserva 2: ferro	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg·l-$^{-1}$
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg·l-$^{-1}$
Solução de reserva 3: oligoelementos	
H_3BO_3	185 $mg \cdot l^{-1}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 $mg \cdot l^{-1}$
$ZnCl_2$	3 $mg \cdot l^{-1}$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 $mg \cdot l^{-1}$
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 $mg \cdot l^{-1}$
Solução de reserva 4: bicarbonato	
$NaHCO_3$	50 $g \cdot l^{-1}$
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Esterilizar as soluções de reserva por filtração através de membrana (diâmetro de poro de 0,2 μm) ou em autoclave (120 °C, 15 min). Armazenar as soluções ao abrigo da luz, a 4 °C.

Não esterilizar as soluções 2 e 4 em autoclave, mas sim por filtração através de membrana.

▼M1

Preparar o meio de cultura adicionando um volume apropriado das soluções de reserva 1-4 à água.

Adicionar a 500 ml de água esterilizada:

— 10 ml da solução de reserva 1

— 1 ml da solução de reserva 2

— 1 ml da solução de reserva 3

— 1 ml da solução de reserva 4

Completar o volume até 1 000 ml, com água esterilizada.

Permitir que decorra um tempo suficiente para que o meio atinja o equilíbrio com o CO_2 atmosférico, se necessário borbulhando com ar estéril filtrado durante algumas horas.

Preparação do meio AAP

A1.1. Adicionar 1 ml de cada uma das soluções de reserva descritas em A1.2.1-A1.2.7 a cerca de 900 ml de água desionizada ou destilada, corrigindo depois o volume até 1 l.

A1.2. As soluções de reserva de macronutrientes são preparadas dissolvendo os seguintes elementos em 500 ml de água desionizada ou destilada. Os reagentes A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 e A1.2.4 podem ser combinados numa única solução de reserva.

A1.2.1. $NaNO_3$ – 12,750 g.

A1.2.2. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ – 6,082 g.

A1.2.3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 2,205 g.

A1.2.4. *Solução de reserva Micronutrientes* (ver o ponto A1.3).

A1.2.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 7,350 g.

A1.2.6. K_2HPO_4 – 0,522 g.

A1.2.7. $NaHCO_3$ – 7,500 g.

A1.2.8. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ — Ver o ponto A1.1.

Nota A1.1 — Utilizar exclusivamente quando a espécie de ensaio for uma diatomácea. O composto pode ser acrescentado directamente (202,4 mg) ou utilizando uma solução de reserva que permita obter uma concentração final de Si de 20 mg/l no meio

A1.3. As soluções de reserva de micronutrientes são preparadas dissolvendo os seguintes elementos em 500 ml de água desionizada ou destilada.

A1.3.1. H_3BO_3 – 92,760 mg.

A1.3.2. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 207,690 mg.

A1.3.3. $ZnCl_2$ – 1,635 mg.

A1.3.4. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ – 79,880 mg.

A1.3.5. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,714 mg.

A1.3.6. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 3,630 mg.

A1.3.7. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,006 mg.

A1.3.8. $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ – 150,000 mg.

[(Etilenodinitrilo)tetraacetato de dissódio].

▼**M1**

A1.3.9. $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,005 mg — Ver o ponto A1.2.

Nota A1.2 — Utilizar exclusivamente no meio para as culturas de arranque de espécies de diatomáceas.

A1.4. Ajustar o pH a 7,5 ± 0,1 com HCl ou NaOH 0,1 *N* ou 1,0 *N*.

A1.5. Filtrar os meios para um recipiente esterilizado através de um filtro de membrana com um diâmetro de poro de 0,22 μm, se se pretender utilizar um contador electrónico de partículas, ou de 0,45 μm, se não for esse o caso.

A1.6. Armazenar o meio ao abrigo da luz, a 4 °C, até ao momento da utilização.

▼M1

Apêndice 3

Exemplo de um procedimento para a cultura de algas

Observações gerais

O objectivo da cultura de acordo com o procedimento a seguir descrito é a preparação de culturas de algas para a realização de ensaios de toxicidade.

Devem ser utilizados métodos que permitam garantir que as culturas de algas não sejam infectadas por bactérias. Mesmo que se pretendam utilizar culturas puras, devem preparar-se e ser conservadas culturas de cada uma das diferentes espécies de algas.

Todas as operações devem ser realizadas em condições de esterilidade, de modo a evitar a contaminação por bactérias ou por outras algas.

Equipamento e material

Ver o ponto «Método de Ensaio»: Equipamento.

Procedimentos para a obtenção de culturas de algas

Preparação das soluções nutrientes (meios):

Todos os sais nutrientes do meio são preparados como soluções de reserva concentradas e armazenados ao abrigo da luz e ao frio. As soluções são esterilizadas por filtração ou em autoclave.

Os meios são preparados misturando a quantidade correcta de solução de reserva com água destilada esterilizada, tomando o cuidado de evitar infecções. Para os meios sólidos, é acrescentado àgar-àgar à concentração de 0,8 %.

Culturas de arranque:

As culturas de arranque são culturas de algas com pequeno volume que são regularmente transferidas para meio fresco, de modo a que possam ser utilizadas como inóculo para os ensaios. Se as culturas não forem regularmente utilizadas, devem ser conservadas por inoculação em tubos com meio de ágar-ágar inclinado. As culturas serão transferidas para meio fresco pelo menos uma vez de dois em dois meses.

As culturas de arranque são feitas em frascos cónicos (com um volume de cerca de 100 ml), com o meio apropriado. Quando as algas forem incubadas a 20 °C com iluminação contínua, será necessário transferi-las a cada semana.

Durante a transferência, uma determinada quantidade da cultura «antiga» é transferida com uma pipeta esterilizada para um frasco com meio fresco, de modo a obter, para as espécies de crescimento rápido, uma concentração inicial cerca de 100 vezes inferior à que existia na cultura original.

A taxa de crescimento de uma espécie pode ser determinada a partir da sua curva de crescimento. A partir do momento em que seja conhecida, é possível estimar a densidade a que a cultura deve ser transferida para o meio fresco. A transferência deve ser feita antes de a cultura atingir a fase de morte celular.

Pré-cultura:

O objectivo da pré-cultura é obter uma quantidade de algas adequada para a inoculação das culturas de ensaio. A pré-cultura será incubada em condições de ensaio e utilizada enquanto se encontra na fase exponencial, normalmente após um período de incubação de 2 a 4 dias. Quando as culturas de algas apresentarem células deformadas ou anormais, devem ser descartadas.

▼M1

Apêndice 4

Análise dos dados por regressão não linear

Considerações de carácter geral

A resposta dos ensaios com algas e de outros ensaios de crescimento microbiano — o aumento da biomassa é, por natureza, uma variável contínua ou métrica — terá a forma de uma taxa quando se utilizar a taxa de crescimento ou de um integral em função do tempo se se escolher utilizar a quantidade de biomassa. Ambas as variáveis serão referenciadas em função da resposta média dos replicados de controlo, não expostos, que apresentem uma resposta mais elevada às condições vigentes — sendo que a temperatura e a luz são os principais factores determinantes nos ensaios com algas. O sistema é distribuído ou homogéneo, e a biomassa pode ser vista como um valor contínuo, sem tomar em consideração as células individuais. A distribuição das variâncias do tipo de resposta está, nesses sistemas, exclusivamente relacionada com os factores experimentais (tipicamente descritos pela curva log-normal ou pela distribuição normal dos erros). Esta situação contrasta com as respostas típicas dos bioensaios com dados quantais, nos quais a tolerância (tipicamente distribuída de forma binomial) de cada organismo é frequentemente assumida como a componente dominante da variância. As respostas dos controlos são, nesse caso, nulas ou correspondentes à linha de base.

Numa situação sem complicações, a resposta normalizada ou relativa, r, diminui de forma monotónica entre 1 (inibição nula) e 0 (inibição a 100 %). De notar que todas as respostas têm um erro associado, pelo que se poderão constatar inibições negativas apenas por efeito dos erros aleatórios.

Análise de regressão

Modelos

O objectivo da análise de regressão é a descrição quantitativa da curva de concentração-resposta, sob a forma de uma função matemática de regressão Y = f (C) ou, mais frequentemente, F (Z), onde Z = log C. A utilização da função inversa $C = f^{-1} (Y)$ permite o cálculo dos valores de EC_x, incluindo EC_{50}, EC_{10} e EC_{20}, bem como dos respectivos limites de confiança a 95 %. Diversas funções matemáticas simples podem ser utilizadas para uma boa descrição da relação concentração-resposta obtida em ensaios de inibição de crescimento com algas. Essas funções incluem, por exemplo, a equação logística, a equação assimétrica de Weibull e a função de distribuição log normal, todas curvas sigmóides que se aproximam da assímptota 1 quando $C \rightarrow 0$ e da assímptota 0 quando $C \rightarrow$ infinito.

A utilização de modelos com uma função de limite contínuo (p. ex.: o modelo Kooijman «para a inibição do crescimento da população», Kooijman et al. 1996) foi recentemente proposta como alternativa aos modelos assimptóticos. Esse modelo assume que não há qualquer efeito às concentrações que se encontram abaixo de um determinado limite, EC0+, estimado por extrapolação, a partir da relação concentração-resposta, do ponto de intercepção do eixo das concentrações, aplicando uma função contínua simples que não é diferenciada no ponto inicial.

De notar que a análise em causa poderá ser uma simples minimização da soma dos mínimos quadrados (assumindo uma variância constante) ou dos quadrados ponderados, quando for necessário compensar para uma variância heterogénea.

▼M1

Procedimento

O procedimento pode ser esquematizado do seguinte modo: seleccionar uma equação Y = f (C) apropriada e ajustá-la aos dados por regressão não linear. Usar, de preferência, as medições de cada frasco, em vez do valor médio dos replicados, de modo a extrair tanta informação quanto possível dos dados disponíveis. Por outro lado, se a variância for elevada, a experiência prática sugere que os valores médios dos replicados podem resultar numa estimativa matematicamente mais robusta e menos influenciada por erros sistemáticos que possam afectar dados do que acontece quando se utilizam os valores medidos em cada frasco.

Desenhar a curva ajustada e marcar os pontos medidos, verificando se há um bom ajustamento. A análise dos mínimos quadrados pode ser um instrumento particularmente útil para esse fim. Se a função escolhida para o ajustamento da curva de concentração-resposta não descrever a totalidade da curva ou de alguma das suas partes essenciais, como por exemplo a resposta a baixas concentrações, seleccionar outra opção de ajustamento da curva — p. ex.: uma curva não simétrica, como a equação de Weibull, em vez de uma curva simétrica. A inibição negativa pode, por exemplo no caso da função de distribuição log--normal, constituir um problema que também poderá tornar necessária a utilização de uma função de regressão alternativa. Não se recomenda a atribuição de um valor zero ou de um valor positivo baixo a esses valores negativos, já que esse procedimento iria distorcer a distribuição dos erros. Poderá ser indicado proceder a diferentes ajustamentos para cada parte da curva, por exemplo na parte da baixa inibição, para estimativa dos valores de $EC_{x\ baixo}$. Calcular, a partir da equação ajustada (por «estimativa inversa», $C = f^{-1}(Y)$) as estimativas de alguns pontos EC_x característicos, comunicando, no mínimo, o valor de EC_{50} e o valor estimado de um ou de dois $EC_{x\ baixo}$. A experiência com ensaios práticos demonstra que a precisão dos ensaios com algas permite normalmente uma estimativa razoavelmente correcta do nível de 10 % de inibição, se se dispuser de um número suficiente de pontos medidos — a não ser nos casos em que haja estimulação a baixas concentrações, que poderá ser factor de confusão. A precisão das estimativas de EC_{20} é muitas vezes consideravelmente maior do que para o EC_{10}, porque o ponto EC_{20} se encontra normalmente na parte central, quase linear, da curva de concentração-resposta. Por vezes, o valor de EC_{10} pode ser difícil de estimar, devido à estimulação do crescimento a baixas concentrações. Assim, embora o EC_{10} possa normalmente ser obtido com uma precisão suficiente, recomenda-se que seja sempre comunicado também o EC_{20}.

Factores de ponderação

Normalmente, a variância experimental não é constante e, na maior parte dos casos, inclui uma componente proporcional, pelo que há vantagem em realizar, por rotina, uma regressão ponderada. Geralmente, assume-se que os factores de ponderação utilizados nesse tipo de análise são inversamente proporcionais da variância:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Diversos programas de regressão permitem a opção de uma análise de regressão ponderada com factores de conversão que são apresentados sob a forma de listas. O mais conveniente será normalizar os factores de ponderação, isto é, multiplicá--los por $n/\Sigma\ w_i$ (em que n é o número de pontos experimentais) de modo a que a respectiva soma seja igual a 1.

Respostas de normalização

A normalização em função da resposta média dos controlos suscita problemas de princípio e tem como resultado uma estrutura de variâncias que é bastante complicada. Ao dividir as respostas pelo valor médio da resposta dos controlos, para obtenção da percentagem de inibição, é introduzido um erro adicional, causado pelo erro que afecta a média dos controlos. A não ser nos casos em que esse erro é negligenciável, os factores de ponderação da regressão e dos limites de confiança terão de ser corrigidos em relação à co-variância com o controlo (17). Cabe aqui notar que é importante obter estimativas de alta precisão do valor médio da resposta dos controlos, de modo a minimizar a variância global para a resposta relativa. Essa variância pode ser descrita do seguinte modo:

▼M1

(o i em índice faz referência ao nível de concentração i, enquanto que o 0 em índice se refere aos controlos)

$$Y_i = \text{Resposta relativa} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

com uma variância de:

$$\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + (\partial Y_i / \partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0)$$

e, tendo em conta que:

$$(\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0 \text{ e } (\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$$

com uma distribuição normal e replicados m_i e m_0:

$$\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

a variância total da resposta relativa, Y_i, passa portanto a ser:

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2\ m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4\ m_0$$

O erro da média dos controlos é inversamente proporcional à raiz quadrada do número de replicados do controlo utilizados para o cálculo dessa média, podendo por vezes justificar-se a inclusão de dados históricos para reduzir fortemente o erro. Outro procedimento alternativo será não normalizar os dados e fazer o ajustamento das respostas absolutas, incluindo os dados de resposta dos controlos, mas introduzindo como parâmetro adicional a ajustar por regressão não linear o valor de resposta dos controlos. No caso das equações de regressão habitualmente utilizadas, com 2 parâmetros, este método exige o ajustamento de 3 parâmetros, pelo que necessita de mais pontos do que a regressão não linear de dados que tenham sido normalizados utilizando uma resposta do controlo pré-definida.

Intervalos de confiança inversos

O cálculo de intervalos de confiança da regressão não linear por estimativa inversa é bastante complexo e não é normalmente uma opção disponível nos pacotes estatísticos informáticos mais comuns. É possível obter uma aproximação dos limites de confiança utilizando programas normais de regressão não linear com reparametrização (Bruce and Versteeg, 1992), o que implica voltar a escrever a equação matemática com os pontos que se pretende estimar, ou seja, EC_{10} e EC_{50}, como os parâmetros a determinar. (Partindo da função I = f (α, β, concentração), utilizar as relações de definição f (α, β, EC_{10}) = 0,1 e f (α, β, EC_{50}) = 0,5 para substituir f (α, β, concentração) por uma função equivalente g (EC_{10}, EC_{50}, concentração).

Um cálculo mais directo (Andersen et al, 1998) poderá ser efectuado mantendo a equação original e utilizando uma expansão de Taylor em redor dos valores médios de r_i e de r_0.

Recentemente, os métodos de «*boot strapping*» têm vindo a ganhar popularidade. Esses métodos utilizam os dados medidos e uma reamostragem frequente, determinada por um gerador de números aleatórios, para estimar uma distribuição empírica da variância.

Bibliografia

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. Water Research, 30, 1625-1632

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J.(1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. Env. Toxicol. Chem.11, 1485-1494

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics, 3, 405-420

▼B

C.4. DETERMINAÇÃO DA BIODEGRADABIL1DADE «FÁCIL»

PARTE I. CONSIDERAÇÕES GERAIS

I.1. INTRODUÇÃO

Descrevem-se seis métodos de ensaio que permitem fazer o despiste da biodegradabilidade fácil de substâncias químicas, num meio aquoso aeróbio:

a) Redução gradual do Carbono Orgânico Dissolvido (COD) (método C.4-A);

b) Método de despiste da OCDE modificado — redução gradual do COD (método C.4-B);

c) Libertação de dióxido de carbono (CO_2) (teste de Sturm modificado) (método C.4-C);

d) Respirometria manométrica (método C.4-D);

e) Frasco fechado (método C.4-E);

f) MITI (Ministério do Comércio Internacional e da Indústria — Japão) (método C.4-F).

As considerações gerais e também as considerações comuns aos seis testes figuram na parte I do método. Os aspectos específicos de cada método são descritos nas partes II a VII. Os apêndices contêm definições, fórmulas e anotações informativas.

Um exercício comparativo interlaboratorial organizado pela OCDE, efectuado em 1988, demonstrou que os métodos permitem obter resultados consistentes. Todavia, consoante as características físicas da substância que se pretende testar, assim se dará preferência a um ou outro método.

I.2. SELECÇÃO DO MÉTODO APROPRIADO

No sentido de se seleccionar o método mais adequado, é essencial dispor de informações sobre a solubilidade, a pressão de vapor e as características de adsorção das substâncias químicas. A estrutura química ou a fórmula química devem ser conhecidas para o cálculo dos valores teóricos e/ou confirmação dos valores medidos dos parâmetros característicos, por exemplo, CTeO, CO_2Te, COD, COT, CQO (ver apêndices 1 e 2).

As substâncias químicas de ensaio que forem solúveis em água na proporção de pelo menos 100 mg/l podem ser avaliadas por todos os métodos, desde que não sejam voláteis e não sejam adsorventes. Para as substâncias químicas que forem pouco solúveis em água, voláteis ou adsorventes, os métodos adequados são indicados no quadro 1. No apêndice 3 é descrito o modo de proceder com as substâncias químicas pouco solúveis em água e com as substâncias químicas voláteis. As substâncias químicas moderadamente voláteis podem ser testadas pelo método de redução gradual do COD, se existir espaço livre suficiente para o gás nos recipientes de ensaio (os quais devem estar adequadamente tapados). Neste caso deve ser efectuado um controlo abiótico que permita detectar eventuais perdas físicas.

▼B

Quadro I

aplicabilidade dos métodos de ensaio

Teste	Método analítico	Adequado para substâncias que são:		
		pouco solúveis	voláteis	adsorvíveis
Redução gradual do COD	Carbono orgânico dissolvido	—	—	+/-
Redução gradual do COD/ /método OCDE	Carbono orgânico dissolvido	—	—	+/-
Libertação de CO_2	Respirometria: libertação de CO_2	+	—	+
Respirometria manométrica	Respirometria manométrica: consumo de oxigénio	+	+/-	+
Frasco fechado	Respirometria: oxigénio dissolvido	+/-	+	+
MITI	Respirometria: consumo de oxigénio	+	+/-	+

É necessário dispor de informações sobre a pureza ou sobre as proporções relativas dos componentes principais do material de ensaio para interpretar os resultados obtidos, especialmente quando os resultados são baixos ou marginais.

O facto de se dispor de informações sobre a toxicidade da substância química de teste em relação às bactérias (apêndice 4) pode ser muito útil para seleccionar concentrações de ensaio adequadas e pode ser essencial para a interpretação correcta de valores baixos de biodegradação.

I.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Para se controlar o processo testam-se substâncias químicas de referência que satisfaçam os critérios de biodegradabilidade fácil, realizando uma experiência num frasco adequado, em paralelo com os procedimentos normais.

As substâncias químicas adequadas são a anilina (recentemente destilada), o acetato de sódio e o benzoato de sódio. Todas estas substâncias químicas de referência degradam-se ao serem submetidas a estes métodos, mesmo quando nenhum inóculo é deliberadamente adicionado.

Foi sugerida a utilização de uma substância química de referência que fosse facilmente biodegradável, mas que necessitasse da adição de um inóculo. Foi sugerida a utilização de hidrogenoftalato de potássio mas é necessário obter mais provas de eficácia com esta substância, antes que possa ser aceite como substância de referência.

Nos ensaios respirométricos, os compostos que contêm azoto podem afectar o consumo de oxigénio devido à nitrificação (ver apêndices 2 e 5).

I.4. PRINCÍPIO DOS MÉTODOS DE ENSAIO

Faz-se a inoculação de uma solução ou suspensão da substância de ensaio num meio mineral e, depois, procede-se à incubação sob condições aeróbias, ao abrigo da luz ou sob luz difusa. A quantidade de COD na solução de ensaio originada pelo inóculo deverá ser mantida o mais baixo possível relativamente à quantidade de COD originada pela substância de ensaio. Tem-se em conta a actividade endógena do inóculo efectuando ensaios paralelos em branco, com inóculo, mas sem a substância de ensaio, embora a actividade endógena das células na presença da substância não seja exactamente a mesma que no controlo endógeno. Efectua-se um ensaio em paralelo com a substância de referência, para verificação do processo.

▼B

Em geral, acompanha-se a degradação determinando parâmetros característicos, tais como o COD, a produção de CO_2 e o consumo de oxigénio, efectuando-se medições com suficiente frequência, de modo a identificar o início e o fim da biodegradação. Com os respirómetros automáticos as medições são contínuas. O COD é por vezes medido em conjunto com outro parâmetro mas normalmente isso só sucede no início e no fim do ensaio. Também se pode recorrer a análises químicas específicas para avaliar a degradação primária da substância de ensaio e para se determinar a concentração de quaisquer substâncias intermédias formadas (obrigatório no teste de MITI).

Normalmente, o ensaio prolonga-se por 28 dias. Todavia, os ensaios podem ser terminados antes de decorridos 28 dias, isto é, logo que a curva de biodegradação tenha atingido um patamar que envolva pelo menos 3 determinações. Os ensaios também podem ser prolongados para além do período de 28 dias, no caso de a curva mostrar que se iniciou a biodegradação mas que o patamar não foi atingido até ao 28.º dia.

I.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

I.5.1. **Reprodutibilidade**

Devido à natureza da biodegradação e das populações bacterianas mistas utilizadas como inóculos, as determinações devem ser efectuadas pelo menos em duplicado.

Sabe-se pela experiência que, quanto maior for a concentração de microorganismos adicionados inicialmente ao meio de ensaio, menores serão as diferenças entre repetições. Ensaios interlaboratoriais demonstram também que pode haver grandes diferenças entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, embora se obtenha, normalmente, uma boa concordância quando se utilizam compostos facilmente biodegradáveis.

I.5.2. **Validade do ensaio**

Considera-se que um ensaio é válido se a diferença entre valores extremos de repetições de desaparecimento da substância química de ensaio, no patamar, no fim do teste ou no final dos 10 dias, for inferior a 20 % e se a percentagem de degradação da substância de referência atingir o nível de biodegradabilidade fácil ao fim de 14 dias. Se qualquer uma destas condições não for satisfeita, o ensaio deve ser repetido. Devido à especificidade dos métodos, os valores baixos não significam necessariamente que a substância de ensaio não seja biodegradável nas condições ambientais, mas significa que serão necessários novos estudos para se provar a biodegradabilidade.

Se num ensaio de toxicidade, contendo tanto a substância de ensaio como a substância química de referência, ocorrer uma degradação inferior a 35 % (tomando como base o COD) ou inferior a 25 % (tomando como base CTeO ou CO_2Te) decorridos 14 dias, pode admitir-se que as substâncias químicas de ensaio são inibidoras (ver também o apêndice 4). As sequências de ensaio deverão ser repetidas, utilizando, se possível, uma concentração inferior da substância química de ensaio e/ou uma concentração superior de inóculo, mas não superior a 30 mg de sólidos/litro.

I.6. PREPARAÇÕES E PROCEDIMENTOS GERAIS

As condições gerais aplicáveis aos ensaios são resumidas no quadro 2. O equipamento e outras condições experimentais correspondentes especificamente a um determinado ensaio são descritas depois, sob o título desse ensaio.

▼B

Quadro 2

condições de ensaio

Ensaio	Redução gradual de COD	Libertação de CO_2	Respirometria manométrica	Despiste da OCDE modificado	Frasco fechado	M1T1 (I)
Concentração da substância de ensaio						
mg/l			100		2–10	100
mg COD/l	10–40	10–20		10–40		
mg CTeO/l			50–100		5–10	
Concentração do inóculo (em células/l, aproximadamente)	≤ 30 mg/l SS ou ≤100 ml de efluente/l (10^7- 10^8)			0,5 ml de efluente secundário/l (10^5)	< 5 ml de efluente/l (10^4- 10^6)	30 mg/l SS (10^7- 10^8)
Concentração de elementos no meio mineral (em mg/l):						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05-0,1				0,05-0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					preferencialmente 7,0
Temperatura	22 ± 2ºC					25 ± 1ºC

COD = Carbono Orgânico Dissolvido CTeO = Carência Teórica de Oxigénio SS =

I.6.1. **Água de diluição**

É usada água desionizada ou destilada, livre de substâncias tóxicas (por exemplo iões Cu^{++}) em concentrações inibidoras. Não deve conter mais do que 10 % do teor de carbono orgânico introduzido pela substância de ensaio. É necessária uma elevada pureza para a água de ensaio para evitar um elevado número de valores em branco. A contaminação pode resultar de impurezas inerentes e também de resinas de permuta iónica e do material lisado de bactérias e algas. Para cada série de ensaios utiliza-se apenas um lote de água, controlada previamente por análise do COD. Tal controlo não é necessário no teste do frasco fechado, mas o consumo de oxigénio da água deve ser baixo.

▼B

I.6.2. **Soluções de reserva de componentes minerais**

Para se preparar as soluções de ensaio recorre-se a utilização de soluções de reserva com concentrações apropriadas de componentes minerais. É possível utilizar as seguintes soluções de reserva (com diversos factores de diluição) para os métodos de redução gradual do COD, despiste da OCDE modificado, libertação de CO_2, respirometria manométrica, ensaio em frasco fechado.

Os factores de diluição e, no caso do ensaio de MITI, a preparação específica do meio mineral, são indicados sob os títulos dos ensaios específicos.

Soluções de reserva:

Preparam-se as seguintes soluções de reserva utilizando reagentes da qualidade analítica.

a) Dihidrogeno-ortofosfato monopotássico, KH_2PO_4 8,50 g

Monohidrogeno-ortofosfato dipotássico, K_2HPO_4 21,75 g

Monohidrogeno-ortofosfato dissódico dihidratado, $Na_2HP0_4 . 2H_2O$ 33,40 g

Cloreto de amónio, NH_4Cl

Dissolver em água e ajustar até ao volume de 1 litro. O pH da solução deverá ser 7,4;

b) Cloreto de cálcio anidro, $CaCl_2$ 27,50 g

ou cloreto de cálcio dihidratado, $CaCl_2 . 2H_2O$ 36,40 g

Dissolver em água e ajustar o volume até 1 litro;

c) Sulfato de magnésio heptahidratado, $MgSO_4 . 7H_2O$ 22,50 g

Dissolver em água e ajustar o volume até 1 litro;

d) Cloreto de ferro (III) hexahidratado, $FeCl_3 . 6H_2O$ 0,25 g

Dissolver em água e ajustar o volume até 1 litro.

Nota: Para não se ter de preparar esta solução imediatamente antes da sua utilização adiciona-se-lhe uma gota de HC1 concentrado ou 0,4 g do sal dissódico do ácido etilenodiarninatetracético (EDTA) por litro.

I.6.3. **Soluções de reserva das substâncias químicas**

Quando a solubilidade for superior a 1 g/l, dissolver 1-10 g, por exemplo, conforme for apropriado, da substância química de ensaio ou de referência em água desionizada e ajustar o volume a 1 litro. Caso contrário, preparar soluções de reserva em meio mineral e adicionar a substância química directamente ao meio mineral. Para o caso de substâncias químicas de menor solubilidade veja-se o apêndice 3; no teste do MITI (método C.4-F) não serão utilizados nem solventes nem agentes emulsionantes.

▼B

I.6.4. **Inóculos**

O inóculo pode ser obtido a partir de uma diversidade de origens: lamas activadas, efluentes de esgotos (não clorados), solos e águas superficiais ou a partir de uma mistura dessas origens. Para os ensaios de redução gradual do COD, de libertação de CO_2 e de respirometria manométrica, no caso de se utilizarem lamas activadas estas devem ser obtidas a partir de uma estação de tratamento ou de uma unidade laboratorial que receba essencialmente águas residuais domésticas. Verificou-se que os inóculos provenientes de outras origens provocam uma maior dispersão de resultados. Nos ensaios de despiste da OCDE modificado e de frasco fechado é necessário um inóculo mais diluído, sem partículas de lama, sendo a fonte preferencial um efluente secundário proveniente de uma estação de tratamento de resíduos domésticos ou de uma unidade laboratorial. No caso do ensaio de MITI, o inóculo provém de uma mistura de origens, sendo descrito sob o título do ensaio específico.

I.6.4.1. *Inóculo de lamas activadas*

Recolher uma amostra de lamas activadas recentes, provenientes de um tanque de arejamento de uma estação de tratamento de esgotos ou de uma unidade laboratorial que trate essencialmente esgotos domésticos. Remover as partículas grosseiras, se necessário por filtração através de um crivo fino, e manter posteriormente as lamas em estado aeróbio.

Em alternativa, deixar sedimentar ou centrifugar (por exemplo, a 1 100 g durante 10 minutos) depois da remoção de todas as partículas grosseiras. Rejeitar o sobrenadante. As lamas podem ser lavadas em meio mineral. Preparar uma suspensão das lamas concentradas em meio mineral, para se obter uma concentração de 3-5 g de sólidos em suspensão/l e efectuar o arejamento enquanto for necessário.

As lamas devem ser obtidas a partir de uma adequada estação de tratamento. Se as lamas forem obtidas de uma estação de tratamento de grandes caudais ou nas quais se admite a presença de inibidores, devem ser lavadas. Deixar sedimentar ou centrifugar as lamas da nova suspensão após mistura profunda, rejeitar o sobrenadante e preparar outra suspensão das lamas lavadas num novo volume de meio mineral. Repetir este procedimento até se concluir que as lamas não possuem inibidor ou substrato em excesso.

Depois de se ter obtido uma nova suspensão, ou quando se utilizam lamas não tratadas, retirar uma amostra imediatamente antes da sua utilização para determinação do resíduo seco correspondente às substâncias sólidas em suspensão.

Outra alternativa consiste em homogeneizar as lamas activadas (3-5 g de sólidos em suspensão/l). Tratar as lamas num misturador mecânico durante 2 minutos, a uma velocidade média. Deixar sedimentar a mistura de lamas durante 30 minutos ou durante um período mais longo, se necessário, e decantar o líquido para utilização como inóculo na proporção de 10 ml/l de meio mineral.

I.6.4.2. *Outras fontes de inóculo*

Este pode ser obtido a partir de um efluente secundário de uma estação de tratamento ou de uma unidade laboratorial que receba essencialmente resíduos domésticos. Recolher uma amostra fresca e conservá-la aerobicamente durante o transporte. Deixar sedimentar durante uma hora ou filtrar através de papel de filtro para partículas grosseiras e conservar aerobicamente o efluente decantado ou o filtrado, enquanto for necessário. Pode utilizar-se até 100 ml deste tipo de inóculo para cada litro de meio.

▼B

As águas superficiais constituem uma fonte adicional de inóculo. Nesse caso, recolher uma amostra de uma água superficial adequada, por exemplo, dos rios ou dos lagos e conservá-la em estado aeróbio enquanto for necessário. Se tal se justificar, concentrar o inóculo por filtração ou por centrifugação.

I.6.5. **Pré-condicionamento dos inóculos**

Os inóculos podem ser pré-condicionados para as condições experimentais mas não podem ser pré-adaptados à substância química de ensaio. O pré-condicionamento consiste em arejar as lamas activadas em meio mineral ou efluente secundário durante cinco a sete dias, à temperatura de ensaio. Por vezes, o pré-condicionamento melhora a precisão dos métodos de ensaio pelo facto de reduzir os valores dos brancos. É desnecessário pré-condicionar o inóculo para o método de MITI.

I.6.6. **Controlos abióticos**

Sempre que necessário, verificar a possível degradação abiótica da substância de ensaio, determinando a remoção do COD, o consumo de oxigénio ou a libertação de dióxido de carbono em controlos estéreis que não contenham inóculo. Esterilizar por filtração através de uma membrana (0,2 - 0,45 mícron) ou adicionando uma substância tóxica adequada numa concentração conveniente. Se é usada membrana de filtração, colhem-se as amostras assepticamente para que se mantenha a esterilidade. A menos que se tenha excluído previamente a adsorção da substância de ensaio, os testes para a medição da biodegradação por remoção do COD, especialmente com inóculo de lamas activas, deverão incluir um controlo abiótico, o qual é inoculado e contaminado.

I.6.7. **Número de frascos**

O número de frascos numa experiência-tipo é descrito nos títulos de cada ensaio.

Podem usar-se os seguintes tipos de frascos:

— suspensão de ensaio: substância de ensaio e inóculo,

— branco de inóculo: somente o inoculo,

— controlo do processo: substância de referência e inóculo,

— controlo abiótico estéril: substância de ensaio, estéril (ver ponto I.6.6),

— controlo de adsorção: substância de ensaio, inóculo e agente esterilizante,

— controlo de toxicidade: substância de ensaio, substância de referência e inóculo.

As determinações na suspensão de ensaio e no branco do inóculo deverão obrigatoriamente ser feitas em paralelo. É também aconselhável fazer as determinações noutro frasco, em paralelo.

Todavia, isto nem sempre é possível. Garantir que são preparadas amostras suficientes ou efectuadas leituras suficientes de modo que possa avaliar-se a remoção percentual no período dos 10 dias.

▼B

I.7. RESULTADOS E AVALIAÇÃO

No cálculo do valor D_t, degradação percentual, utilizam-se os valores médios das medições em duplicado dos parâmetros tanto nos recipientes de ensaio como no branco do inóculo. As fórmulas são apresentadas a seguir, nas secções correspondentes sobre os ensaios específicos. A evolução da degradação é representada graficamente, sendo indicado o período dos 10 dias. Calcular e registar a remoção percentual alcançada no final do período dos 10 dias e o valor no patamar ou no final do ensaio, conforme o caso.

Nos ensaios respirométricos os compostos que contêm azoto podem afectar o consumo de oxigénio, devido a fenómenos de nitrificação (ver os apêndices 2 e 5).

I.7.1. **Degradação medida através da determinação do COD**

Para o cálculo da percentagem de degradação (D_t), é colhida uma amostra num dado momento, o qual deverá ser calculado separadamente para cada um dos frascos que contêm a substância a testar, usando os valores médios das medições em duplicado do COD, com o fim de se poder avaliar a validade do teste (ver ponto I.5.2). Para o cálculo usa-se a seguinte equação:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

em que:

D_t = % de degradação no momento t,

C_o = concentração média inicial de COD no meio de cultura inoculado que contém a substância de ensaio (mg de COD/l),

C_t = concentração média de COD no meio de cultura inoculado que contém a substância de ensaio, no momento t (mg de COD/l),

C_{bo} = concentração média inicial de COD no branco de meio mineral inoculado (mg de COD/l),

C_{bt} = concentração média de COD no branco de meio mineral inoculado no momento t (mg de COD/l).

Todas as concentrações são medidas experimentalmente.

I.7.2. **Degradação medida através de análise específica**

No caso de existirem dados analíticos específicos, calcular a biodegradação primária pela fórmula:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

em que:

D_t = % de degradação no momento t, normalmente após 28 dias,

S_a = quantidade residual de substância de ensaio no meio inoculado no final do ensaio (mg),

S_b = quantidade residual de substância de ensaio no teste em branco que utiliza água/meio a que apenas se adicionou a substância de ensaio (mg).

▼B

I.7.3. **Degradação abiótica**

Quando é usado um controlo estéril abiótico, usa-se para o cálculo da percentagem de degradação abiótica, a fórmula seguinte:

$$\% \text{ de degradação abiótica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

em que:

$C_{s(o)}$ = concentração COD no controlo estéril no dia zero,

$C_{s(t)}$ = concentração COD no controlo estéril no dia t.

I.8. RELATÓRIO

O relatório de ensaio deverá conter, se possível, as informações seguintes:

— substâncias químicas de ensaio e de referência e o seu grau de pureza,

— condições de ensaio,

— inóculo: natureza e locais de amostragem, concentração e qualquer tratamento de pré-condicionamento,

— proporção e natureza dos resíduos industriais existentes nas águas residuais, se forem conhecidas,

— duração e temperatura do ensaio,

— nos casos das substâncias químicas de ensaio pouco solúveis, qual o tratamento efectuado,

— método de ensaio aplicado; deverão ser apresentadas e explicadas as razões científicas de qualquer modificação de procedimento,

— folha de dados,

— qualquer fenómeno de inibição observado,

— qualquer degradação abiótica observada,

— dados analíticos químicos específicos, se os houver,

— dados analíticos químicos sob intermediários, se os houver,

— o gráfico da degradação percentual em função do tempo para as substâncias de ensaio e de referência, a fase de latência, a fase de degradação, o período dos 10 dias e o declive, deverão ser claramente indicados (apêndice 1). Se o teste foi sujeito a um critério de validade, as percentagens médias de degradação nos frascos com a substância de ensaio podem ser usadas para o gráfico,

— a remoção percentual depois do período dos 10 dias, e no patamar ou no final do ensaio.

PARTE II. **ENSAIO DA REDUÇÃO GRADUAL DO COD** (método C.4-A)

II.1. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Ao abrigo da luz ou sob luz difusa e à temperatura de 22 ± 2 °C faz-se o arejamento de um determinado volume de meio mineral inoculado, contendo uma concentração conhecida da substância de ensaio (10-40 mg COD/l) como única fonte nominal de carbono orgânico.

▼B

Acompanha-se a degradação por análise frequente do COD ao longo de um período de 28 dias. Calcula-se o grau de biodegradação, exprimindo a concentração de COD removido (corrigida em função do branco de inóculo de controlo) em percentagem da concentração inicialmente presente. O grau de biodegradação primária também pode ser calculado através de uma análise química complementar efectuada no início e no fim da incubação.

II.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

II.2.1. **Equipamento**

a) Frascos cónicos, por exemplo, com capacidade entre 250 ml e 2 1, consoante o volume necessário para a análise do COD;

b) Máquina agitadora — para os frascos cónicos, com controlo automático de temperatura ou, em alternativa, utilizada a uma temperatura ambiente constante, e com potência suficiente para manter condições aeróbias em todos os frascos;

c) Equipamento de filtração, com membranas adequadas;

d) Analisador de COD;

e) Equipamento para determinar o oxigénio dissolvido;

f) Centrifugadora.

II.2.2. **Preparação do meio mineral**

Para a preparação da solução de reserva, ver ponto I.6.2.

Misturar 10 ml de solução (a) com 800 ml de água de diluição, adicionar 1 ml das soluções (b) a (d) e ajustar o volume a 1 litro com água de diluição.

II.2.3. **Preparação e pré-condicionamento do inóculo**

O inóculo pode ser obtido de várias origens: lamas activadas; efluentes de esgotos; águas de superfície; solos ou misturas destes.

Ver pontos I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 e 1.6.5.

II.2.4. **Preparação dos frascos**

A título de exemplo, introduzir quantidades de 800 ml de meio mineral em frascos cónicos com a capacidade de 2 litros e adicionar volumes suficientes das soluções de reserva que contêm as substâncias de ensaio e de referência a frascos separados, para se obter uma concentração de substância química equivalente a 10-40 mg de COD/l. Controlar os valores do pH e ajustá-los, se necessário, para 7,4. Inocular os frascos com lamas activadas ou com outra fonte de inóculos (ver ponto I.6.4), para se obter uma concentração final não superior a 30 mg de sólidos em suspensão/l. Preparar também os controlos de inóculo em meio mineral mas sem a substância química de ensaio ou de referência.

Se necessário, utilizar um recipiente para verificação do possível efeito inibidor da substância química de ensaio, inoculando uma solução que contenha, num meio mineral, concentrações comparáveis das substâncias químicas de ensaio e de referência.

Ainda no caso de ser necessário, preparar outro frasco estéril para verificar se a substância química de ensaio se degrada abioticamente, utilizando uma solução não inoculada contendo a substância química (ver ponto I.6.6).

▼B

Para além disso, no caso de se suspeitar que a substância química de ensaio é significativamente adsorvida pelo vidro, lamas, etc., efectuar uma avaliação preliminar para se determinar o grau provável da adsorção e, consequentemente, se determinar se o ensaio é adequado à substância química (ver quadro 1). Preparar um frasco com a substância de ensaio, o inóculo e o agente esterilizante.

Ajustar os volumes em todos os frascos a 1 litro, utilizando meio mineral e, depois de se misturar, retirar uma amostra de cada frasco para determinar a concentração inicial de COD (ver apêndice 2.4). Tapar as aberturas dos frascos, por exemplo com folha de alumínio, de modo a permitir a permuta livre de ar entre o frasco e a atmosfera envolvente. Colocar depois os recipientes na máquina agitadora e iniciar o ensaio.

II.2.5. **Número de frascos numa experiência-tipo**

De preferência:

Frascos 1 e 2: suspensão de ensaio;

Frascos 3 e 4: branco do inóculo;

Frasco 5: controlo.

Se necessário, ainda:

Frasco 6: controlo abiótico estéril;

Frasco 7: controlo da adsorção;

Frasco 8: controlo da toxicidade.

Ver ponto I.6.7.

II.2.6. **Realização do ensaio**

Ao longo do ensaio, determinar as concentrações de COD em cada frasco em duplicado, a intervalos de tempo conhecidos suficientemente frequentes que permitam determinar o início do período dos 10 dias e a remoção percentual no final do período dos 10 dias. Utilizar apenas o volume mínimo de suspensão de ensaio necessário para cada determinação.

Antes da colheita de amostras, repor as perdas dos frascos por evaporação, adicionando água de diluição (ponto I.6.1) na quantidade requerida, se for necessário. Homogeneizar o meio de cultura antes de se retirar a amostra e garantir que o material aderente às paredes dos recipientes é dissolvido ou se mantém em suspensão antes da colheita de amostras. Filtrar através de membranas ou centrifugar (ver apêndice 2.4), imediatamente após a colheita de amostras. Analisar no mesmo dia as amostras filtradas ou centrifugadas ou, caso contrário, armazená-las à temperatura de 2-4 ºC durante um período máximo de 48 horas, ou a uma temperatura inferior a - 18 ºC no caso de um período mais longo.

II.3. RESULTADOS E RELATÓRIO

II.3.1. **Tratamento dos resultados**

Calcular a percentagem de degradação no momento t conforme referido no ponto I.7.1 (determinação do COD) e, facultativamente, conforme referido no ponto I.7.2 (análise específica).

Registar todos os resultados nas folhas de dados fornecidas.

▼B

II.3.2. **Validade dos resultados**

Ver ponto I.5.2.

II.3.3. **Relatório**

Ver ponto I.8.

II.4. FOLHA DE DADOS

Como exemplo de folha de dados apresenta-se a seguinte:

ENSAIO DE REDUÇÃO GRADUAL DO COD

1. **LABORATÓRIO**

2. **DATA DO INÍCIO DO ENSAIO**

3. **SUBSTÂNCIA DE ENSAIO**

Nome:

Concentração da solução de reserva: ... mg/l da substância

Concentração inicial no meio, t_o: ... mg/l da substância

4. **INÓCULO**

Origem:

Tratamento efectuado:

Pré-condicionamento, se o houver:

Concentração das substâncias sólidas em suspensão na mistura reaccional: mg/l

5. **DETERMINAÇÕES DE CARBONO**

Analisador de carbono:

	Nº do frasco		COD decorridos n dias (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Substância química de ensaio e inóculo	1	a_1					
		a_2					
		a, média $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, média $C_{b(t)}$					

▼B

	Nº do frasco		COD decorridos n dias (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Branco de inóculo sem substância de ensaio	3	c_1					
		c_2					
		c, média $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, média $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **AVALIAÇÃO DOS DADOS BÁSICOS**

Nº do frasco		% de degradação decoridos n dias				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Média (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 e D_2 não devem ser ponderados, se há uma diferença considerável.

Nota: É possível utilizar fórmulas idênticas para a substância química de referência e para os controlos de toxicidade.

7. **CONTROLO ABIÓTICO** (facultativo)

	Tiempo (días)	
	0	t
conc. de COD (mg/l) en el control estéril	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ de degradação abiótica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANÁLISE QUÍMICA ESPECÍFICA** (facultativa)

	Quantidade residual da subastância de ensaio no final do teste (mg/l)	% degradação
Controlo estéri	S_b	

▼B

	Quantidade residual da subastância de ensaio no final do teste (mg/l)	% degradação
Meio de ensaio inoculado	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTE III. **TESTE DE DESPISTE DA OCDE MODIFICADO** (método C.4-B)

III.1. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Utilizando 0,5 ml de efluente por litro de meio faz-se a inoculação de um determinado volume de meio mineral, contendo uma concentração conhecida da substância de ensaio (10-40 mg de COD/l) como única fonte nominal de carbono orgânico. Faz-se o arejamento da mistura ao abrigo da luz ou sob luz difusa, à temperatura de 22 ± 2 ºC.

Acompanha-se a degradação por análise frequente do COD ao longo de um período de 28 dias. Calcula-se o grau de biodegradação, exprimindo a concentração de COD removido (corrigida em função do branco de inóculo de controlo) em percentagem da concentração inicialmente presente. O grau de biodegradação primária também pode ser calculado através de uma análise química complementar efectuada no início e no fim da incubação.

III.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

III.2.1. Equipamento

a) Frascos cónicos, por exemplo, com capacidade entre 250 ml e 2 1, consoante o volume necessário para a análise do COD;

b) Máquina agitadora — para os frascos cónicos, com controlo automático de temperatura ou, em alternativa, utilizada a uma temperatura ambiente constante, e com potência suficiente para manter condições aeróbias em todos os frascos;

c) Equipamento de filtração, com membranas adequadas;

d) Analisador de COD;

e) Equipamento para determinar o oxigénio dissolvido;

f) Centrifugadora.

III.2.2. **Preparação do meio mineral**

Para a preparação da solução de reserva, ver ponto I.6.2.

Misturar 10 ml de solução (a) com 800 ml de água de diluição, adicionar 1 ml das soluções (b) a (d) e ajustar o volume a 1 litro com a água de diluição.

Neste método utiliza-se como inóculo apenas 0,5 ml de efluente/litro pelo que pode ser necessário reforçar o meio com oligoelementos e factores de crescimento. Esta operação efectua-se adicionando 1 ml de cada uma das soluções a seguir indicadas por litro de meio final.

▼B

Solução de oligoelementos:

Sulfato de manganés tetrahidratado, $MnSO_4 . 4H_{20}$	39,9 mg
Ácido bórico, H_3BO_3	57,2 mg
Sulfato de zinco heptahidratado, $ZnSO_4 . 7H_{20}$	42,8 mg
Heptamolibdato de amónio, $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Quelato de Fe ($FeCl_3$ — ácido etilenodiaminatetracético)	100,0 mg
Dissolver e ajustar o volume a 1 000 ml com água de diluição	
Solução vitamínica:	
Extracto de levedura	15,0 mg

Dissolver o extracto de levedura em 100 ml de água. Esterilizar, fazendo passar através de uma membrana de 0,2 mícron ou preparar de fresco.

III.2.3. **Preparação e pré-condicionamento do inóculo**

O inóculo é derivado de um efluente secundário de uma estação de tratamento ou laboratório, que recebe predominantemente esgotos domésticos. Ver pontos I.6.4.2 e I.6.5.

Utiliza-se 0,5 ml por litro de meio mineral.

III.2.4. **Preparação dos frascos**

A título de exemplo, introduzir quantidades de 800 ml de meio mineral em frascos cónicos com a capacidade de 2 litros e adicionar volumes suficientes das soluções de reserva que contêm as substâncias de ensaio e de referência a frascos separados, para se obter uma concentração de substância química equivalente a 10-40 mg de COD/l. Controlar o valor do pH e ajustá-lo, se necessário, para 7,4. Inocular os frascos com efluente de águas residuais para se obter uma concentração de 0,5 ml/litro (ver ponto I.6.4.2). Preparar também os controlos de inóculo em meio mineral mas sem a substância química de ensaio ou de referência.

Se necessário, utilizar um recipiente para verificação do possível efeito inibidor da substância química do ensaio, inoculando uma solução que contenha, num meio mineral, concentrações comparáveis das substâncias químicas de ensaio e de referência.

Ainda se necessário, preparar outro frasco estéril para verificar se a substância química de ensaio se degrada abioticamente, utilizando uma solução não inoculada contendo a substância química (ver ponto 1.6.6).

Para além disso, no caso de se suspeitar que a substância química de ensaio é significativamente adsorvida pelo vidro, lamas, etc., efectuar uma avaliação preliminar para se determinar o grau provável de adsorção e, consequentemente, se determinar se o ensaio é adequado à substância química (ver quadro 1). Preparar um frasco com a substância de ensaio, o inóculo e o agente esterilizante.

Ajustar os volumes em todos os frascos a 1 litro, utilizando meio mineral e, depois de se misturar, retirar uma amostra de cada frasco para determinar a concentração inicial de COD (ver apêndice 2.4). Tapar as aberturas dos frascos, por exemplo com folha de alumínio, de modo a permitir a permuta livre de ar entre o frasco e a atmosfera envolvente. Colocar depois os recipientes na máquina agitadora e iniciar o ensaio.

▼B

III.2.5. **Número de frascos numa experiência-tipo**

De preferência:

Frascos 1 e 2: suspensão de ensaio,

Frascos 3 e 4: branco do inóculo,

Frasco 5: controlo;

Se necessário, ainda:

Frasco 6: controlo abiótico estéril, Frasco 7: controlo da adsorção,

Frasco 8: controlo da toxicidade.

Ver ainda o ponto I.6.7.

III.2.6. **Realização do ensaio**

Ao longo do ensaio, determinar as concentrações de COD em cada frasco em duplicado, a intervalos de tempo conhecidos suficientemente frequentes que permitam determinar o início do período dos 10 dias e a remoção percentual no final do período dos 10 dias. Utilizar apenas o volume mínimo de suspensão de ensaio necessário para cada determinação.

Antes da colheita de amostras, repor as perdas dos frascos por evaporação, adicionando água de diluição (ponto I.6.1) na quantidade requerida, se for necessário. Homogeneizar o meio de cultura antes de se retirar a amostra e garantir que o material aderente às paredes dos recipientes é dissolvido ou se mantém em suspensão antes da colheita de amostras. Filtrar através de membranas ou centrifugar (ver apêndice 2.4), imediatamente após a colheita de amostras. Analisar no mesmo dia as amostras filtradas ou centrifugadas ou, caso contrário, armazená-las à temperatura de 2-4 ºC durante um período máximo de 48 horas, ou a uma temperatura inferior a — 18 ºC no caso de um período mais longo.

III.3. RESULTADOS E RELATÓRIO

III.3.1. **Tratamento dos resultados**

Calcular a percentagem de degradação no momento t conforme referido no ponto I.7.1 (determinação do COD) e, facultativamente, conforme referido no ponto I.7.2 (análise específica).

Registar todos os resultados nas folhas de dados fornecidas.

III.3.2. Validade dos resultados

Ver ponto I.5.2.

III.3.3. Relatório

Ver ponto I.8.

III.4. FOLHA DE DADOS

Como exemplo de folha de dados apresenta-se a seguinte:

ENSAIO DE DESPISTE DA OCDE MODIFICADO

1. **LABORATÓRIO**

2. **DATA DO INÍCIO DO ENSAIO**

▼B

3. **SUBSTÂNCIA DE ENSAIO**

Nome:

Concentração da solução de reserva: mg/l da substância

Concentração inicial no meio, t_o:mg/l da substância

4. **INÓCULO**

Origem:

Tratamento efectuado:

Pré-condicionamento, se o houver:

Concentração das substâncias sólidas em suspensão na mistura reaccional: mg/l

5. **DETERMINAÇÕES DE CARBONO**

Analisador de carbono:

	Nº do frasco		COD decorridos n dias (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Substância química de ensaio e inóculo	1	a_1					
		a_2					
		a, média $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, media $C_{b(t)}$					
Branco de inóculo sem substância de ensaío	3	c_1					
		c_2					
		c, media $C_{b(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, media $C_{b(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **AVALIAÇÃO DOS DADOS BÁSICOS**

Nº do frasco		% de degradação decorridos n dias				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Nº do frasco		% de degradação decorridos n dias				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Média (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 e D_2 não devem ser ponderados, se há uma diferença considerável.

Nota: É possível utilizar fórmulas idênticas para a substância química de referência e para os controlos de toxicidade.

7. **CONTROLO ABIÓTICO** (facultativo)

	Tempo (dias)	
	0	t
Concentração do COD (mg/l) no controlo estéril	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ de degradação abiótica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANÁLISE QUÍMICA ESPECÍFICA** (facultativa)

	Quantidade residual da substância de ensaio no final do teste	% degradação primária
Controlo estéril	S_b	
Meio de ensaio inoculado	S^a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTE IV. ENSAIO DA LIBERTAÇÃO DE CO_2 (método C.4-C)

IV.1. PRINCÍPIO DO MÉTODO

às escuras ou sob luz difusa faz-se passar um caudal controlado de ar isento de dióxido de carbono, para o arejamento de um volume determinado de meio mineral inoculado, contendo uma concentração conhecida da substância química de ensaio (10-20 mg de COD ou de COT/l) como única fonte nominal de carbono orgânico. Acompanha-se a degradação ao longo de 28 dias, determinando o dióxido de carbono produzido, o qual é retido em hidróxido de bário ou em hidróxido de sódio e é medido por titulação do hidróxido residual ou na forma de carbono inorgânico. A quantidade de dióxido de carbono produzido pela substância química de ensaio (corrigida em função dos valores obtidos a partir do branco de inóculo) exprime-se em percentagem do valor CO_2Te. O grau de biodegradação também pode ser calculado por uma análise complementar do COD efectuada no início e no fim da incubação.

▼B

IV.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

IV.2.1. **Equipamento**

a) Frascos de 2-5 litros, cada um deles munido de um tubo de arejamento que atinge as proximidades do fundo do recipiente e com uma abertura de saída;

b) Agitadores magnéticos, quando se fizer a avaliação de substâncias químicas pouco solúveis;

c) Frascos de absorção de gás;

d) Dispositivo para controlar e medir o fluxo de ar;

e) Equipamento para remoção do dióxido de carbono, para obtenção de ar isento de dióxido de carbono; em alternativa, utilizar uma mistura de oxigénio isento de CO_2 e de azoto isento de CO_2, provenientes de garrafas, nas proporções correctas (20 % de O_2: 80 % de N_2);

f) Dispositivo para a determinação do dióxido de carbono, recorrendo a titulação (volumetria) ou utilizando algum tipo de analisador do carbono inorgânico;

g) Dispositivo de filtração por membranas (facultativo);

h) Analisador de COD (facultativo).

IV.2.2. **Preparação do meio mineral**

Para a preparação das soluções de reserva ver ponto I.6.2.

Misturar 10 ml de solução (a) com 800 ml de água de diluição, adicionar 1 ml das soluções (b) a (d) e ajustar o volume a 1 litro com água de diluição.

IV.2.3. **Preparação e pré-condicionamento do inóculo**

O inóculo pode ser obtido de várias origens: lamas activadas; efluentes de esgotos; águas de superfície; solos ou misturas destes.

Ver pontos I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 e I.6.5.

IV.2.4. **Preparação dos frascos**

A título de exemplo, os volumes e massas a seguir indicados representam valores para frascos de 5 litros que contenham 3 litros de suspensão. No caso de se utilizarem volumes menores, modificar os correspondentes valores em conformidade mas garantir que o dióxido de carbono formado possa ser medido com exactidão.

A cada frasco de 5 litros adicionar 2 400 ml de meio mineral. Adicionar um volume adequado das lamas activadas preparadas (ver ponto I.6.4.1 e I.6.5) para se obter uma concentração de substâncias sólidas em suspensão não superior a 30 mg/l, no volume final de 3 l de mistura inoculada. Em alternativa, diluir primeiro as lamas preparadas, de modo a obter-se uma suspensão de 500-1 000 mg/l em meio mineral, antes de se adicionar uma alíquota ao conteúdo do balão de 5 litros, de modo a obter-se uma concentração de 30 mg/l; esta operação garante uma grande precisão. É possível utilizar outras fontes de inóculo (ver ponto I.6.4.2).

Arejar estas misturas inoculadas, utilizando ar isento de CO_2, durante a noite, para purgar o dióxido de carbono do sistema.

▼B

Adicionar a substância de ensaio e a substância de referência, separadamente, a partir de volumes conhecidos das soluções de reserva, a frascos idênticos repetidos, para se obterem concentrações, modificadas pelas substâncias químicas adicionadas, de 10 a 20 mg de COD ou de COT/l; não adicionar substâncias químicas a alguns dos frascos para serem utilizados como controlos do inóculo. Adicionar as substâncias químicas de ensaio pouco solúveis directamente aos frascos, tomando como base a sua massa ou volume, ou proceder conforme descrito no apêndice 3.

Se necessário, utilizar um frasco para verificar o possível efeito inibidor da substância química de ensaio, adicionando as substâncias químicas de ensaio e de referência nas mesmas concentrações dos outros frascos.

Se necessário, utilizar também um frasco estéril para verificar se a substância química de ensaio se degrada abioticamente, utilizando uma solução não inoculada da substância química (ver ponto I.6.6.). Esterilizar adicionando urna substância tóxica numa concentração adequada.

Ajustar os volumes das suspensões em todos os frascos a 3 litros, adicionando meio mineral previamente arejado com ar isento de CO_2. Facultativamente, podem retirar-se amostras para análise do COD (ver apêndice 2.4) e/ou para análises específicas. Ligar os recipientes de absorção às saídas de ar dos frascos.

No caso de se utilizar hidróxido de bário, ligar em série três frascos de absorção, contendo cada um 100 ml de uma solução de hidróxido de bário 0,0125 M, a cada frasco de 5 litros. A solução deve estar isenta de sulfatos e carbonatos precipitados e a sua concentração deve ser determinada imediatamente antes da utilização. No caso de se utilizar hidróxido de sódio, ligar dois frascos colectores, actuando o segundo como elemento de controlo para demonstrar que todo o dióxido de carbono foi absorvido no primeiro. Nos frascos de absorção as rolhas de frascos de soro são adequadas. Adicionar 200 ml de uma solução de hidróxido de sódio 0,05 M a cada frasco, quantidade que é suficiente para absorver a quantidade total de dióxido de carbono libertado até à degradação completa da substância química de ensaio. A solução de hidróxido de sódio, ainda que recentemente preparada, conterá vestígios de carbonatos; efectua-se a correcção correspondente, deduzindo os carbonatos do branco.

IV.2.5. **Número de frascos numa experiência-tipo**

Balão 1 e 2: suspensão de ensaio;

Balão 3 e 4: branco do inóculo;

Frasco 5: controlo.

De preferência e se necessário, ainda:

Frasco 6: controlo abiótico estéril;

Frasco 7: controlo da toxicidade.

Ver também ponto I.6.7.

IV.2.6. **Realização do ensaio**

Iniciar o ensaio fazendo borbulhar ar isento de CO_2 nas suspensões, com um caudal de 30-100 ml/minuto. Retirar periodicamente amostras do absorvente do dióxido de carbono, para análise do teor de CO_2. Durante os primeiros 10 dias recomenda-se que as análises sejam feitas de dois em dois ou de três em três dias e, depois, de cinco em cinco dias até ao 28.º dia, de modo que seja possível identificar o período dos 10 dias.

▼B

Ao 28.º dia, retirar amostras (facultativo) para análise do COD e/ou análises específicas, medir o pH das suspensões e adicionar a cada frasco 1 ml de ácido clorídrico concentrado; arejar os frascos durante a noite para remoção do dióxido de carbono existente nas suspensões de ensaio. No 29.º dia efectuar a última análise do dióxido de carbono libertado.

Nos dias das medições de CO_2, desligar o dispositivo de absorção de hidróxido de bário mais próximo do frasco e fazer a titulação da solução de hidróxido, utilizando HCl 0,05 M e fenolftalina como indicador. Deslocar os outros dispositivos de absorção para uma posição mais próxima do frasco e colocar um novo dispositivo de absorção, contendo 100 ml de hidróxido de bário 0,0125 M recente, na extremidade mais afastada da série. Efectuar as titulações conforme necessário, por exemplo, quando se observar uma precipitação substancial no primeiro frasco de absorção e antes que seja evidente qualquer precipitação no segundo ou logo que aí se note uma precipitação fraca. Em alternativa, utilizando NaOH como absorvente, retirar com uma seringa uma pequena amostra (depende das características do analisador de carbono utilizado) da solução de hidróxido de sódio do dispositivo de absorção mais próximo do frasco. Injectar a amostra na zona correspondente ao CI do analisador de carbono para analisar directamente o dióxido de carbono libertado.

Analisar o teor no segundo frasco de absorção apenas no final do ensaio para corrigir qualquer passagem de dióxido de carbono.

IV.3. RESULTADOS E RELATÓRIO

IV.3.1. **Tratamento dos resultados**

A quantidade de CO_2 reti
da num dispositivo de absorção, quando titulada, é dada por:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

em que:

V = volume de HCl utilizado na titulação dos 100 ml existentes no dispositivo de absorção (ml),

C_B = concentração da solução de hidróxido de bário (M),

C_A = concentração da solução de ácido clorídrico (M),

se C_B for 0,0125 M e C_A for 0,05 M, a titulação, para 100 ml de hidróxido de bário, será de 50 ml, e a massa de CO_2 será dada por:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml de HCl titulado} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

Sendo assim, no caso presente, para se converter o volume de HCl titulado em mg de CO_2 produzido, utiliza-se o factor 1,1.

Calcular a massa do CO_2 produzido a partir do inóculo isolado e a partir do inóculo e da substância química de ensaio, utilizando os respectivos valores de titulação, correspondendo a diferença à massa de CO_2 produzido apenas a partir da substância química de ensaio.

Por exemplo, se o inóculo isoladamente conduzir a uma titulação de 48 ml e o inóculo e a substância química de ensaio conduzirem a uma titulação de 45 ml, então:

CO_2 proveniente do inóculo = 1,1 × (50-48) = 2,2 mg

▼B

CO_2 proveniente do inóculo e da substância química de ensaio = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg

pelo que a massa do CO_2 produzido a partir da substância química de ensaio será de 3,3 mg.

A percentagem de biodegradação calcula-se pela expressão:

$$\% \text{ de degradação} = \frac{\text{mg de } CO_2 \text{ produzido} \times 100}{CO_2\text{Te} \times \text{mg substância química de ensaio adicionada}}$$

ou

$$\% \text{ de degradação} = \frac{\text{mg de } CO_2 \text{ produzido} \times 100}{\text{mg de COT adicionado no ensaio} \times 3,67}$$

sendo o valor 3,67 o factor de conversão (44/12) de carbono em dióxido de carbono.

Obtém-se a percentagem de degradação decorrido qualquer intervalo de tempo, somando as percentagens de CO_2Te, cujo cálculo foi efectuado em cada um dos dias até ao momento em que se faz a medição.

Para os dispositivos de absorção de hidróxido de sódio, calcular a quantidade de dióxido de carbono produzida, expressa em Cl (mg), multiplicando a concentração de CI no absorvente pelo volume desse absorvente.

Calcular a percentagem de degradação pela expressão:

$$\% \text{ de } CO_2\text{Te} = \frac{\text{mg CI do frasco de ensaio} - \text{mg CI do branco}}{\text{MG COT adicionado como substância química de ensaio}} \times 100$$

Calcular as variações de COD (facultativo) conforme descrito no ponto I.7. Registar este e todos os outros resultados na folha de dados fornecida.

IV.3.2. **Validade dos resultados**

O teor de Cl da suspensão da substância química de ensaio em meio mineral, no início do ensaio, deve ser inferior a 5 % do valor do CT, e a libertação total de CO_2 no branco de inóculo, no final do ensaio, não deve normalmente exceder 40 mg/l de meio. No caso de serem obtidos valores superiores a 70 mg de CO_2/l, deverá fazer-se uma análise crítica dos resultados e da técnica experimental.

Ver também o ponto I.5.2.

IV.3.3. **Relatório**

Ver ponto I.8.

IV.4. FOLHA DE DADOS

Como exemplo de uma folha de dados apresenta-se a seguinte.

ENSAIO DA LIBERTAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO

1. **LABORATÓRIO**

2. **DATA DO INÍCIO DO ENSAIO**

3. **SUBSTÂNCIA DE ENSAIO**

Nome:

Concentração da solução de reserva: mg/l da substância

▼B

Concentração inicial no meio: mg/l da substância

C total adicionado ao frasco: mg de C

CO_2Te: mg de CO_2

4. **INÓCULO**

Origem:

Tratamento efectuado:

Pré-condicionamento, se o houver:

Concentração das substâncias sólidas em suspensão na mistura reaccional: mg/l

5. **PRODUÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO E DEGRADABILIDADE**

Método: $Ba(OH)_2$/NaOH/outro ...

Tempo (dia)	CO_2 formado ensio (mg)		CO_2 formado bianco (mg)		$C0_2$ formado acumulado (mg) (ensaio menos branco)		% de CO_2Te $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	média	3 / 4	média	1	2	1	2	média
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Nota: Podem ser utilizados esquemas idênticos para a substância química de referência e para os controlos de toxicidade.

6. **ANÁLISE DO CARBONO** (facultativa)

Analisador de carbono:

Tempo (dia)	Branco mg/l	Substância química de ensaio mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) ou no final da incubação.

▼B

$$\% \text{ de COD removido} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **DEGRADAÇÃO ABIÓTICA** (facultativo)

$$\% \text{ de degradação abiótica} = \frac{\text{formação de } CO_2 \text{ em frasco estéril decorridos ki dias (mg)}}{CO_2\text{Te (mg)}} \times 100$$

PARTE V. **ENSAIO DE RESPIROMETRIA MANOMÉTRICA** (método C.4-D)

V.1. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Agita-se um volume determinado de meio mineral inoculado, contendo uma concentração conhecida da substância química de ensaio (substância de ensaio na concentração de 100 mg/l, para dar pelo menos 50-100 mg de CTeO/l) como única fonte nominal de carbono orgânico, num frasco fechado, a uma temperatura constante (± 1 ºC ou mais precisa), durante um período de 28 dias. Determina-se o consumo de oxigénio, medindo a quantidade de oxigénio (produzido electroliticamente) necessária para manter constante o volume de gás no frasco do respirómetro, ou, em alternativa, recorrendo à variação de volume ou de pressão (ou a uma combinação de ambas) no aparelho. O dióxido de carbono libertado é absorvido por uma solução de hidróxido de potássio ou por outro absorvente adequado. A quantidade de oxigénio consumida pela substância química de ensaio (corrigida em função do consumo paralelo do branco de inóculo) exprime-se em percentagem de CTeO ou CQO. Facultativamente, a biodegradação primária também pode ser calculada através de uma análise específica suplementar, efectuada no início e no fim da incubação, e a biodegradação total por análise do COD.

V.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

V.2.1. **Equipamento**

a) Respirómetro adequado;

b) Controlo de temperatura, a ± 1 ºC ou mais precisa;

c) Dispositivo de filtração por membranas (facultativo);

d) Analisador de carbono (facultativo).

V.2.2. **Preparação do meio mineral**

Para a preparação das soluções de reserva ver ponto I.6.2.

Misturar 10 ml da solução (a) com 800 ml de água de diluição, adicionar 1 ml das soluções (b) a (d) e ajustar o volume a 1 litro com água de diluição.

V.2.3. **Preparação e pré-condicionamento do inóculo**

O inóculo pode ser obtido de várias origens: lamas activadas; efluentes de esgotos; águas de superfície; solos ou misturas destes.

Ver pontos I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 e I.6.5.

V.2.4. **Preparação dos frascos**

Preparar soluções das substâncias químicas de ensaio e de referência, em lotes separados, em meio mineral, com uma concentração, em geral, de 100 mg de substância química/l, para dar pelo menos 50--100 mg de CTeO/l, utilizando as soluções de reserva.

▼B

Calcular o valor de CTeO com base na formação de sais de amónio, a não ser que se preveja a existência de nitrificação, caso em que o cálculo deverá basear-se na formação de nitrato (ver apêndice 2.2).

Determinar os valores do pH e, se necessário, ajustá-los a 7,4 ± 0,2.

As substâncias pouco solúveis devem ser adicionadas numa fase posterior (ver adiante).

No caso de se pretender determinar a toxicidade da substância química de ensaio, preparar outra solução em meio mineral, contendo as substâncias químicas de ensaio e de referência em concentrações idênticas às das soluções individuais.

Se for necessário efectuar a medição do consumo físico-químico de oxigénio, preparar uma solução da substância química de ensaio, normalmente na concentração de 100 mg de CTeO/l, previamente esterilizada por adição de uma substância tóxica adequada (ver I.6.6).

Introduzir o volume necessário das soluções das substâncias de ensaio e de referência nos frascos correspondentes, pelo menos em duplicado. Adicionar a outros frascos apenas meio mineral (para os controlos de inóculo) e, se necessário, a solução mista das substâncias químicas de ensaio/referência e a solução estéril.

Se a substância química de ensaio for pouco solúvel, adicioná-la directamente nesta fase, tomando como base a massa ou o volume, ou proceder conforme descrito no apêndice 3. Adicionar hidróxido de potássio, grânulos de soda ou outro absorvente aos compartimentos do dispositivo de absorção de CO_2.

V.2.5. **Número de frascos numa experiência-tipo**

De preferência:

Frascos 1 e 2: suspensão de ensaio;

Frascos 3 e 4: branco do inóculo;

Frasco 5: controlo;

Se necessário, ainda:

Frasco 6: controlo abiótico estéril;

Frasco 7: controlo da toxicidade.

Ver também o ponto I.6.7.

V.2.6. **Realização do ensaio**

Deixar que os recipientes atinjam a temperatura desejada e inocular os recipientes adequados com as lamas activadas preparadas ou com outra fonte de inóculo, para se obter uma concentração de substâncias sólidas em suspensão não superior a 30 mg/l. Montar o equipamento, iniciar a agitação, verificar a estanquidade e começar a medir o consumo de oxigénio. Normalmente, não é necessária maior atenção do que efectuar as leituras necessárias e efectuar verificações diárias para se poder actuar no sentido de se manter a temperatura correcta e uma agitação adequada.

Calcular o consumo de oxigénio a partir das leituras efectuadas a intervalos de tempo regulares e frequentes, utilizando os métodos fornecidos pelo fabricante do equipamento. No final da incubação, normalmente decorridos 28 dias, medir o valor do pH do conteúdo dos frascos, especialmente no caso de os consumos de oxigénio serem baixos ou superiores ao valor da $CTeO_{NH4}$ (para os compostos que contêm azoto).

▼B

Se necessário, retirar amostras dos frascos do respirómetro, na fase inicial e na fase final, para análise do COD ou da substância química específica (ver apêndice 2.4). No momento da recolha da amostra inicial, garantir que se conhece o volume da suspensão de ensaio que permanece no frasco. Quando o oxigénio é consumido por uma substância de ensaio que contenha azoto, determinar o acréscimo da concentração de nitrito e de nitrato ao longo de 28 dias e calcular a correcção decorrente do oxigénio consumido por nitrificação (apêndice 5).

V.3. RESULTADOS E RELATÓRIO

V.3.1. **Tratamento dos resultados**

Dividir o consumo de oxigénio (mg) da substância química de ensaio decorrido um determinado período (corrigido em função do branco de inóculo de controlo correspondente ao mesmo período) pela massa da substância química de ensaio utilizada. Deste modo, obtém-se o valor CBO, expresso em mg de oxigénio/mg de substância química de ensaio, ou seja:

$$\text{CBO} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ consumido pela subst. de ensaio} - \text{mg } O_2 \text{ consumido pelo branco})}{(\text{mg de substância de ensaio no frasco})}$$

= mg de O_2 por mg de substância de ensaio no frasco

Calcula-se a percentagem de biodegradação pela expressão:

$$\%\text{ de biodegradação} = \%\text{ CTeO} = \frac{\text{CBO (mg } O_2/\text{mg de substância química)}}{\text{CTeO (mg } O_2 \text{ de substância química)}} \times 100$$

ou pela expressão:

$$\%\text{ CQO} = \frac{\text{CBO(mg } O_2/\text{mg de substância química)}}{\text{CQO(mg } O_2 \text{ de substância química)}} \times 100$$

Note-se que estes dois métodos não conduzirão necessariamente ao mesmo valor, sendo preferível utilizar o primeiro.

Utilizar o valor apropriado da CTeO (NH_4 ou NO_3), consoante se conheça ou se preveja a ocorrência da nitrificação (apêndice 2.2). Se ocorrer nitrificação mas esta não for completa, calcular a correcção decorrente do oxigénio consumido por nitrificação, a partir das variações na concentração de nitrito e nitrato (apêndice 5).

Quando se fazem determinações facultativas de carbono orgânico e/ou de substâncias químicas específicas, calcular a percentagem de degradação conforme descrito no ponto I.7.

Registar todos os resultados nas folhas de dados anexas.

V.3.2. **Validade dos resultados**

O consumo de oxigénio pelo branco de inóculo é, normalmente, de 20-30 mg de O_2/l e não deverá ser superior a 60 mg/l em 28 dias. Os valores superiores a 60 mg/l exigem uma análise crítica dos resultados e das técnicas experimentais. Se o valor do pH estiver fora do intervalo 6-8,5 e se o consumo de oxigénio pela substância química de ensaio for inferior a 60 %, o ensaio deve ser repetido com uma concentração inferior de substância química de ensaio.

Ver também o ponto I.5.2.

▼B

V.3.3. **Relatório**

Ver ponto I.8.

V.4. **FOLHA DE DADOS**

Como exemplo de folha de dados apresenta-se a seguinte:

ENSAIO DE RESPIROMETRIA MANOMÉTRICA

1. **LABORATÓRIO**

2. **DATA DO INÍCIO DO ENSAIO**

3. **SUBSTÂNCIA DE ENSAIO**

Nome:

Concentração da solução de reserva: ... mg/l

Concentração inicial no meio, C_o: ...mg/l

Volume no frasco de ensaio (V): ...ml

CTeO ou CQO: ...mg O_2/mg de substância de ensaio (NH_4, NO_3)

4. **INÓCULO**

Origem: ...

Tratamento efectuado: ...

Pré-condicionamento, se o houver: ...

Concentração das substâncias sólidas em suspensão na mistura reaccional: ...mg/l

5. **CONSUMO DE OXIGÉNIO: BIODEGRADABILIDADE**

		Tempo (días)											
		0		7		14			21			28	
O_2 consumido (mg), substância de ensaio	1												
	2												
	a, média												
O_2 consumido (mg) branco	3												
	4												
	b, média												
CBO corrigida (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
CBO por mg de substância de ensaio	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Tempo (días)											
		0		7		14			21			28	
% degradação $\frac{CBO}{CTeO} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Média (*)												

V = volume de meío no frasco de ensaio.
(*) D_1 e D_2 não devem ser ponderados, se há uma diferença considerável.

N.B: Podem ser utilizados esquemas idênticos para a substância química de referência e para os controlos de toxicidade.

6. **CORRECÇÃO PARA A NITRIF1CAÇÃO** (ver apêndice 5)

Dia		0	28	Diferença
i)	Concentração de nitrato (mg N/l)			(N)
ii)	Equivalente de oxigénio (4,57 X N × V) (mg)	—	—	
iii)	Concentração de nitrito (mg N/l)			(N)
iv)	Equivalente de oxigénio (3,43 × N X V) (mg)	—	—	
ii) + iv)	Total de equivalente de oxigénio	—	—	

7. **ANÁLISE DO CARBONO** (facultativa)

Analisador de carbono:

Tempo (dia)	Branco mg/l	Substância química de ensaio mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) ou no final da incubação.

$$\% \text{ de COD removido} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SUBSTÂNCIA QUÍMICA ESPECÍFICA** (facultativo)

S_b = concentração no controlo físico-químico (estéril) decorridos 28 dias,

S_a = concentração no frasco inoculado decorridos 28 dias,

$$\% \text{ de biodegradação} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **DEGRADAÇÃO ABIÓT1CA** (facultativo)

a = consumo de oxigénio em frascos estéreis decorridos 28 dias (mg)

$$\text{consumo de oxigénio por mg de substância química de ensaio} = \frac{a \times 100}{C_o V}$$

▼B

(ver secções 1 e 3),

$$\% \text{ de degradação abiótica } = \frac{a \times 100}{C_o V \times CTeO}$$

PARTE VI. **ENSAIO EM FRASCO FECHADO** (métodoC.4-E)

VI.1. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Faz-se a inoculação da solução da substância química de ensaio em meio mineral, normalmente na concentração de 2-5 mg/l, utilizando um número relativamente pequeno de microorganismos provenientes de uma população mista e mantém-se em frascos fechados, completamente cheios, ao abrigo da luz e a uma temperatura constante. Acompanha-se a degradação pela análise do oxigénio dissolvido ao longo de um período de 28 dias. A quantidade de oxigénio consumido pela substância química de ensaio, corrigida em função do consumo paralelo do branco de inóculo, exprime-se em percentagem dos valores CTeO ou CQO.

VI.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

VI.2.1. **Equipamento**

a) Frascos para CBO com rolhas de vidro, por exemplo, com a capacidade de 250-300 ml;

b) Banho ou incubador, para manter os frascos a uma temperatura constante (± 1 ºC ou mais precisa), ao abrigo da luz;

c) Frascos de vidro grandes (2-5 1) para a preparação dos meios e para enchimento dos frascos para CBO;

d) Eléctrodo de oxigénio e medidor, ou equipamento e reagentes para a titulação de Winkler.

VI.2.2. **Preparação do meio mineral**

Para a preparação da solução de reserva ver ponto I.6.2.

Misturar 1 ml das soluções (a) a (d) e ajustar o volume a 1 litro com água de diluição.

VI.2.3. **Preparação do inóculo**

O inóculo é normalmente obtido dum efluente secundário duma estação de tratamento ou duma unidade laboratorial, que recebe predominantemente esgotos domésticos. Uma origem alternativa para o inóculo é a água de superfície. Usa-se normalmente de uma gota (0,05 ml) a 5 ml de filtrado por litro de meio. Podem ser necessárias várias tentativas para se descobrir o volume óptimo de dado efluente (ver pontos I.6.4.2 e I.6.5).

VI.2.4. **Preparação dos frascos**

Arejar fortemente o meio mineral durante pelo menos 20 minutos. Efectuar cada série de ensaios com meio mineral proveniente do mesmo lote. De um modo geral, o meio estará pronto para utilização depois de ter estado em repouso durante 20 horas, à temperatura de ensaio. Determinar a concentração do oxigénio dissolvido para efeitos de controlo; esse valor deve ser de aproximadamente 9 mg/l à temperatura de 20 ºC. Efectuar todas as operações de transferência e de enchimento de meio saturado com ar sem formação de bolhas, por exemplo, utilizando sifões.

▼B

Paralelamente, preparar outros grupos de frascos para CBO, para a determinação das substâncias químicas de ensaio e de referência em séries experimentais simultâneas. Preparar um número suficiente de frascos para CBO, incluindo os brancos de inóculo, de modo que possam efectuar-se as medições de consumo de oxigénio, pelo menos em duplicado, com os intervalos de ensaio desejados, por exemplo, decorridos 0, 7, 14, 21 e 28 dias. Para se assegurar a identificação do período dos 10 dias, podem ser necessários mais frascos.

Adicionar meio mineral completamente arejado aos frascos grandes de modo que estes fiquem cheios até um terço. Adicionar depois quantidade suficiente das soluções de reserva da substância química de ensaio e da substância química de referência a frascos grandes distintos, de modo que a concentração final das substâncias químicas não seja normalmente superior a 10 mg/l. Não adicionar nenhuma substância química ao branco de controlo do meio, contido noutro frasco grande.

Para não se limitar a actividade do inóculo, garantir que a concentração do oxigénio dissolvido não desça abaixo de 0,5 mg/l nos frascos para CBO. Isto limita a concentração da substância química de ensaio a cerca de 2 mg/l. Contudo, nos casos de compostos dificilmente degradáveis e dos que têm um valor de CTeO baixo, pode prever-se 5-10 mg/l. Em alguns casos, é aconselhável efectuar uma série de experiências paralelas, com a substância química de ensaio em duas concentrações diferentes, por exemplo, 2 e 5 mg/l. Normalmente, calcula-se o valor da CTeO com base na formação de sais de amónio mas, se se souber que há nitrificação ou se esta for previsível, efectua-se o cálculo com base na formação de nitrato ($CTeO_{NO3}$: ver apêndice 2.2). Todavia, havendo nitrificação mas não sendo esta completa, efectua-se a correcção em função das variações da concentração de nitrito e de nitrato, determinadas por análise (ver apêndice 5).

No caso de se pretender investigar a toxicidade da substância química de ensaio (por exemplo, no caso de se ter verificado previamente um fraco valor de biodegradabilidade), é necessária outra série de frascos.

Preparar outro frasco grande para meio mineral arejado (cheio até um terço do seu volume), mais a substância química de ensaio e a substância química de referência com os valores finais de concentração, normalmente idênticos aos dos outros frascos grandes.

Inocular as soluções dos frascos grandes com efluente secundário (uma gota, ou cerca de 0,05 ml, até 5 ml/l) ou de outra origem, tal como a água dos rios (ver ponto I.6.4.2). Finalmente, ajustar o volume das soluções com meio mineral arejado, utilizando um tubo que atinja o fundo do frasco de modo a obter-se uma mistura adequada.

VI.2.5. **Número de frascos numa experiência-tipo**

Numa experiência-tipo utilizam-se os frascos seguintes:

— pelo menos 10 contendo a substância química de ensaio e o inóculo (suspensão de ensaio),

— pelo menos 10 contendo apenas inóculo (branco de inóculo),

— pelo menos 10 contendo a substância química de referência e o inóculo (controlo),

▼B

— e, se necessário, seis frascos contendo a substância química de ensaio, a substância química de referência e o inóculo (controlo de toxicidade). Contudo, para se assegurar a identificação do período dos 10 dias, será necessário utilizar o dobro dos frascos.

VI.2.6. Realização do ensaio

Distribuir imediatamente cada solução preparada pelo respectivo grupo de frascos para CQO, utilizando um tubo que mergulhe até um quarto do fundo (e não no fundo) do frasco grande, de modo que todos os frascos para CQO fiquem completamente cheios. Bater suavemente para remover quaisquer bolhas de ar. Verificar, logo no momento inicial, a existência de oxigénio dissolvido nos frascos, recorrendo a análises, pelos métodos de Winkler ou do eléctrodo. O conteúdo dos frascos pode ser conservado para análise posterior pelo método de Winkler, adicionando sulfato de manganés (II) e hidróxido de sódio (o primeiro é o reagente de Winkler). Armazenar os frascos cuidadosamente tapados, contendo o oxigénio retido na forma de óxido de manganés (III) hidratado, que é castanho, ao abrigo da luz e à temperatura de 10 ºC-20 ºC, durante um período inferior a 24 horas, antes de continuar com os outros passos do método de Winkler. Rolhar os restantes frascos em duplicado, garantindo que não contêm bolhas de ar, e incubar à temperatura de 20 ºC, ao abrigo da luz. Cada série deve ser acompanhada por uma outra série paralela completa, para as determinações no branco de meio inoculado. De cada série, retirar pelo menos dois frascos idênticos para análise do oxigénio dissolvido, a intervalos de tempo regulares (pelo menos semanalmente) durante os 28 dias de incubação.

A amostragem semanal deve permitir avaliar a remoção percentual num período de 14 dias, ao passo que as amostras recolhidas cada três, quatro dias devem permitir identificar o período dos 10 dias, o que exigirá o dobro dos frascos.

Para as substâncias de ensaio que contêm azoto, devem ser feitas correcções que dêem conta do consumo de oxigénio provocado por qualquer fenómeno de nitrificação que possa ocorrer. Para efectuar esta operação, recorrer ao método do eléctrodo de O_2 para a determinação da concentração do oxigénio dissolvido e, depois, retirar uma amostra do frasco para a CBO, para a análise de nitrito e de nitrato. A partir do acréscimo na concentração de nitrito e de nitrato, calcular o oxigénio utilizado (ver apêndice 5).

VI.3. RESULTADOS E RELATÓRIO

VI.3.1. **Tratamento dos resultados**

Calcular primeiro a CBO que se manifesta após cada período, subtraindo a redução de oxigénio (mg de O_2/l) no branco de inóculo do valor determinado para a substância química de ensaio. Dividir esta redução corrigida pela concentração (mg/l) da substância química de ensaio, para se obter o valor CBO específico, em miligrama de oxigénio por miligrama de substância química de ensaio. Calcular a percentagem de biodegradabilidade, dividindo o valor CBO específico pelo valor CTeO específico (calculado em conformidade com o apêndice 2.2) ou pelo valor CQO (determinado por análise, ver apêndice 2.3) ou seja:

$$\text{CBO} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ consumido pela subst. de ensaio} - \text{mg } O_2 \text{ consumido pelo branco})}{(\text{mg de substância de ensaio no frasco})}$$

▼B

= mg de O_2 por mg de substância de ensaio

$$\% \text{ de degradação} = \frac{\text{CBO (mg } O_2/\text{mg de substância de ensaio)}}{\text{CTeO (mg } O_2/\text{ mg de substância de ensaio)}} \times 100$$

ou

$$\% \text{ de degradação} = \frac{\text{CBO (mg } O_2/\text{mg de substância de ensaio)}}{\text{CQO (mg } O_2/\text{ mg de substância de ensaio)}} \times 100$$

Note-se que estes dois métodos não conduzirão necessariamente ao mesmo valor, sendo preferível utilizar o primeiro.

Para as substâncias de ensaio que contêm azoto, utilizar os valores CTeO adequados (NH_4 ou NO_3) conforme exista ou se admita que possa ocorrer nitrificação (apêndice 2.2). Se houver nitrificação, não sendo esta completa, calcular a correcção decorrente do oxigénio consumido por nitrificação, a partir da variação na concentração de nitrito e de nitrato (apêndice 5).

VI.3.2. **Validade dos resultados**

A redução do oxigénio no branco de inóculo não deve exceder 1,5 mg de oxigénio dissolvido/l decorridos 28 dias. Valores superiores a esse exigem uma análise cuidadosa das técnicas experimentais. A concentração de oxigénio residual nos frascos de ensaio não deverá descer abaixo de 0,5 mg/litro em nenhuma ocasião. Esses níveis baixos de oxigénio apenas são válidos se o método utilizado para a determinação do oxigénio dissolvido permitir medir tais níveis com exactidão.

Ver também o ponto I.5.2.

VI.3.3. **Relatório**

Ver I.8.

VI.4. FOLHA DE DADOS

Como exemplo de folha de dados apresenta-se a que se segue.

ENSAIO DO FRASCO FECHADO

1. **LABORATÓRIO**

2. **DATA DO INÍCIO DO ENSAIO**

3. **SUBSTÂNCIA DE ENSAIO**

Nome: ...

Concentração da solução de reserva: ... mg/l

Concentração inicial no frasco: ... mg/l

CTeO ou CQO: mg 0_2/mg de substância de ensaio

4. **INÓCULO**

Origem: ...

Tratamento efectuado: ...

▼B

Pré-condicionamento, se o houver: ...

Concentrações das substâncias sólidas em suspensão na mistura reaccional: ... ml/l

5. **DETERMINAÇÕES DO OD**

Método: Winkler/eléctrodo.

Análises em frasco

Tempo de incubação (d)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Branco (sem substância química)	1	C_1				
	2	C_2				
Média	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Substância de ensaio	1	a_1				
	2	a_2				
Média	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

NB: Podem ser utilizados esquemas idênticos para a substância química de referência e para os controlos de toxicidade

6. **CORRECÇÃO DEVIDA A NITRIFICAÇÃO** (ver apêndice 5)

Tempo de incubação (d)		0	n_1	n_2	n_3
i)	Concentração de nitrato (mg N/l)				
ii)	Variação na concentração de nitrato (mg N/l)	—			
iii)	Equivalente de oxigénio (mg/l)	—			
iv)	Concentração de nitrito (mg N/l)				
v)	Variação na concentração de nitrito (mg N/l)	—			
vi)	Equivalente de oxigénio (mg/l N/l)	—			
iii) + vi)	Equivalente de oxigénio total (mg/l)	—			

7. **REDUÇÃO DO OD: % DE DEGRADAÇÃO**

	Redução decorridos n dias (mg/l))			
	n_1	n_2	n_3	
Frasco 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
Frasco 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Redução decorridos n dias (mg/l))			
	n_1	n_2	n_3	
Frasco 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})]}{\text{conc. de ensaio} \times \text{CTeO da subs. quím.}} \times 100$				
Frasco 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})]}{\text{conc. de ensaio} \times \text{CTeO da subs. quím.}} \times 100$				
$\%\ D\ \text{média}\ (*) = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Não retomar o valor médio, se existirem diferenças consideráveis entre os duplicados.

m_{to} = valor no frasco de ensaio no tempo 0,

m_{tx} = valor no frasco de ensaio no tempo x,

m_{bo} = valor médio do branco no tempo 0,

m_{bx} = valor médio do branco no tempo x.

Aplicar também a correcção decorrente da nitrificação, com base em iii) + vi) da secção 6.

8. **REDUÇÕES DE OD NO BRANCO**

Consumo de oxigénio no branco: (m_{bo} - m_{b28}) mg/l. Este consumo é importante para a validade do ensaio. Deve ser inferior a 1,5 mg/l.

PARTE VII. **ENSAIO DE MITI** (método C.4-F)

VII.1. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Mede-se automaticamente a absorção de oxigénio por uma solução ou suspensão agitada, contendo a substância química de ensaio num meio mineral, inoculada com microorganismos inadaptados e especialmente desenvolvidos, durante um período de 28 dias, num respirómetro encerrado, ao abrigo da luz e à temperatura de 25 ± 1 ºC. A absorção do dióxido de carbono libertado faz-se com cal sódica. Exprime-se a biodegradabilidade pela percentagem do consumo de oxigénio (corrigida em função do consumo do branco) em relação ao consumo teórico (CTeO). Calcula-se também a percentagem de biodegradabilidade primária, a partir de uma análise química específica complementar, efectuada no início e no fim da incubação, por exemplo, por análise do COD.

VII.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

VII.2.1. **Equipamento**

a) Medidor de CBO electrolítico automático ou respirómetro, normalmente equipado com seis frascos de 300 ml cada um e também equipado com recipientes para o absorvente de CO_2;

▼B

b) Sal. de temperatura constante e/ou banho à temperatura de 25 ± 1 ºC ou mais precisa;

c) Dispositivo de filtração por membranas (facultativo);

d) Analisador de carbono (facultativo).

VII.2.2. **Preparação do meio mineral**

Preparar as seguintes soluções de reserva, utilizando reagentes de qualidade analítica e água (ponto I.6.1):

a)	Dihidrogeno-ortofosfato monopotássico, KH_2PO_4	8,50 g
	Monohidrogeno-ortofosfato dipotássico, K_2HPO_4	21,75 g
	Monohidrogeno-ortofosfato dissódico dodecahidratado, Na_2HPO_4 12 H_2O	44,60 g
	Cloreto de amónio, NH_4Cl	1,70 g
	Dissolver em água e ajustar o volume a 1 litro.	
	O valor do pH da solução deve ser de 7,2;	
b)	Sulfato de magnésio heptahidratado, $MgSO_4$ 7 H_2O	22,50 g
	Dissolver em água e ajustar o volume a 1 litro;	
c)	Cloreto de cálcio anidro, $CaCl_2$	27,50 g
	Dissolver em água e ajustar o volume a 1 litro;	
d)	Cloreto de ferro (III) hexahidratado, $FeCl_3$. 6 H_2O	0,25 g
	Dissolver em água e ajustar o volume a 1 litro.	

Retirar 3 ml de cada uma das soluções a), b), c) e d) e ajustar o volume a 1 litro.

VII.2.3. **Preparação do inóculo**

Recolher amostras recentes em pelo menos dez locais, sobretudo em áreas onde sejam utilizados e descarregados diversos produtos químicos. Em locais tais como as estações de tratamento de águas residuais, estações de tratamento de esgotos industriais, rios, lagos, mar, recolher 1 litro de amostras de lamas, solo superficial, água, etc., e misturar tudo muito bem. Após a remoção dos materiais flutuantes, deixar repousar e ajustar o pH do sobrenadante a 7 ± 1, utilizando hidróxido de sódio ou ácido fosfórico.

Utilizar um volume adequado de sobrenadante filtrado para encher um recipiente próprio para lamas activadas com dispositivo de enchimento e esvaziamento. Arejar o líquido durante cerca de 23,5 horas. Trinta minutos após a interrupção do arejamento, rejeitar cerca de um terço do volume total do sobrenadante e adicionar igual volume de uma solução (pH 7) contendo glucose, peptona e ortofosfato monopotássico de concentração 0,1 % em qualquer destes componentes, ao material sedimentado, e recomeçar o processo de arejamento. Repetir este procedimento uma vez por dia. A unidade de lamas deve operar de acordo com as seguintes boas práticas: os efluentes deverão ser límpidos, a temperatura deverá ser mantida a 25 ± 2 ºC e o pH deverá ser 7 ± 1, a sedimentação das lamas deverá ser boa, arejamento suficiente para manter a mistura permanentemente em condições aeróbias, presença de protozoários, devendo testar-se a actividade das lamas por comparação com uma substância de referência, pelo menos cada três meses. Não utilizar lamas como inóculo sem que tenha decorrido pelo menos um mês de operação, mas não mais do que quatro meses. Seguidamente, colher amostras em pelo menos 10 locais a intervalos regulares, uma vez em cada três meses.

▼B

Para se manter a mesma actividade nas lamas frescas e nas antigas, misturar o sobrenadante filtrado de lamas activadas em utilização com igual volume de sobrenadante filtrado de uma mistura recentemente obtida a partir de dez origens e fazer a cultura do caldo combinado conforme anteriormente descrito. Recolher as lamas para utilização como inóculo decorridas 18-24 horas sobre a alimentação da unidade de lamas.

VII.2.4. **Preparação dos frascos**

Preparar os seis frascos seguintes:

N.º 1: substância química de ensaio em água de diluição, a 100 mg/l

N.os 2, 3 e 4: substância química de ensaio em meio mineral, a 100 mg/l

N.º 5: substância química de referência (por exemplo, anilina) em meio mineral, a 100 mg/l

N.º 6: apenas meio mineral

Adicionar directamente as substâncias químicas de ensaio pouco solúveis, com base na sua massa ou volume ou proceder conforme descrito no apêndice 3, com a excepção de não ser conveniente utilizar nem solventes nem agentes emulsionantes. Adicionar o absorvente de CO_2 a todos os frascos, colocando-o nos recipientes especiais existentes. Ajustar o valor do pH a 7,0, nos frascos n.os 2, 3 e 4.

VII.2.5. **Realização do ensaio**

Inocular os frascos n.os 2, 3 e 4 (suspensões de ensaio), n.º 5 (controlo de actividade) e n.º 6 (branco de inóculo) com um pequeno volume de inóculo, para se obter uma concentração de sólidos em suspensão de 30 mg/l. Não se adiciona nenhum inóculo ao frasco n.º 1, que serve como controlo abiótico. Montar o equipamento, verificar a sua estanquidade, pôr os agitadores em movimento e começar a medição do consumo de oxigénio ao abrigo da luz. Verificar diariamente a temperatura, os agitadores e o registador coulombimétrico do consumo de oxigénio, e registar quaisquer modificações de cor no conteúdo dos frascos. Fazer a leitura dos consumos de oxigénio referentes aos seis frascos directamente, por um método apropriado, por exemplo a partir dos seis gráficos do registador das curvas de CBO. No final da incubação, normalmente decorridos 28 dias, medir o valor do pH do conteúdo dos frascos e determinar a concentração residual da substância química de ensaio e de qualquer produto intermediário e, no caso de substâncias solúveis na água, a concentração do COD (apêndice 2.4). Tomar precauções especiais no caso das substâncias químicas voláteis. No caso de se prever nitrificação, determinar a concentração de nitrato e de nitrito, se possível.

VII.3. RESULTADOS E RELATÓRIO

VII.3.1. **Tratamento dos resultados**

Dividir o consumo de oxigénio (mg) da substância química de ensaio, correspondente a um determinado período, pela massa da substância química de ensaio utilizada, corrigindo aquele com o valor referente ao branco de inóculo de controlo correspondente ao mesmo período. Obtém-se assim a CBO, expressa em mg de oxigénio/mg de substância química de ensaio, ou seja:

$$\text{CBO} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ consumido pela subst. de ensaio} - \text{mg } O_2 \text{ consumido pelo branco})}{(\text{mg de substância de ensaio no frasco})}$$

= mg de O_2/mg de substância de ensaio

▼B

Deste modo, obtém-se a percentagem de biodegradação pela expressão:

$$\%\ \text{biodegradação} = \%\ \text{CTeO} = \frac{\text{CBO (mg } O_2\text{/mg de substância química)}}{\text{CTeO (mg } O_2\text{/ mg de substância química)}} \times 100$$

Para misturas, calcular a CTeO por análise elementar, tal como para um composto único. Utilizar o valor de CTeO adequado ($CTeO_{NH4}$ ou $CTeO_{NO3}$) consoante não haja nitrificação ou esta seja completa (apêndice 2.2). Todavia, se houver nitrificação mas se esta for incompleta, efectuar uma correcção decorrente do oxigénio consumido por nitrificação, calculado a partir das variações nas concentrações de nitrito e de nitrato (apêndice 5).

Calcular a percentagem de biodegradação primária a partir das perdas da substância química específica (original) (ver ponto I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Se tiver havido uma perda de substância química de ensaio no frasco n.º 1, medir a variação físico-química, registar esse facto e utilizar a concentração da substância química de ensaio (Sb) decorridos 28 dias, nesse frasco, para calcular a percentagem de biodegradação.

No caso de se efectuarem determinações de COD (facultativas), calcular a percentagem de biodegradação final pela expressão:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

conforme descrito no ponto I.7.1. Se tiver havido uma perda de COD no frasco n.º 1, ao medir-se a remoção por via físico-química, deve utilizar-se a concentração de GOD nesse frasco para calcular a percentagem de biodegradação.

Registar todos os resultados na folha de dados anexa.

VII.3.2. **Validade dos resultados**

O oxigénio consumido pelo branco de inóculo é, normalmente, de 20-30 mg de O_2/l e não deverá ser superior a 60 mg/l em 28 dias. Os valores superiores a 60 mg/l exigem uma análise crítica dos resultados e das técnicas experimentais. No caso de o valor do pH estar fora do intervalo 6-8,5 e se o oxigénio consumido pela substância de ensaio for inferior a 60 %, o ensaio deverá ser repetido com uma concentração inferior de substância química de ensaio.

Ver também o ponto I.5.2.

Se a percentagem de degradação da anilina, calculada a partir do consumo de oxigénio, não exceder 40 %, decorridos sete dias, e 65 %, decorridos catorze dias, o ensaio não deve ser considerado válido.

VII.3.3. **Relatório**

Ver ponto I.8.

VII.4. FOLHA DE DADOS

Como exemplo de folha de dados apresenta-se a seguinte:

ENSAIO DO MITI (I)

1. **LABORATÓRIO**

2. **DATA DO INÍCIO DO ENSAIO**

▼B

3. **SUBSTÂNCIA DE ENSAIO**

Nome:

Concentração da solução de reserva: mg/l da substância

Concentração inicial no meio, C_o: mg/l da substância

Volume da mistura reaccional: ml

CTeO: mg O_2/l

4. **INÓCULO**

Locais de colheita das amostras de lama:

1. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...

Concentração de sólidos em suspensão nas lamas activadas depois de aclimatização com águas residuais sintéticas = mg/l,

Volume de lamas activadas por litro de meio final = ml,

Concentração de lamas no meio final = mg/l.

5. **CONSUMO DE OXIGÉNIO: BIODEGRADABILIDADE**

Tipo de respirómetro utilizado:

			Tempo (dias)				
			0	7	14	21	28
O_2 consumido (mg) pela substância de ensaio	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 consumido (mg) pelo branco	b						
O_2 consumido (mg) corrigido	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
CBO por mg de substância química de ensaio	$\frac{(a-b)}{C_oV}$	Frasco 1					
		Frasco 2					
		Frasco 3					
% de degradação $\frac{CBO}{CTeO} \times 100$		1					
		2					
		3					
		média (*)					

(*) Não retomar o valor médio, se existirem diferenças consideráveis entre os duplicados.

▼B

NB: Podem ser utilizados esquemas idênticos para a substância química de referência.

6. **ANÁLISE DE CARBONO** (opcional)

Analisador de carbono:

Frasco	COD				% de COD removido	Média
	Medido		Corrigido			
Água + substância de ensaio	a				—	—
Lamas + substância de ensaio	b_1		b_1 - c			
Lamas + substância de ensaio	b_2		b_2 - c			
Lamas + substância de ensaio	b_3		b_3 - c			
Branco de controlo	c		—		—	—

$$\% \text{ de COD removido } \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DADOS ANALÍTICOS ESPECÍFICOS DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA**

	Quantidade residual de substância de ensaio no final do teste	% de degradação
ensaio em branco com água	S_b	
meio inoculado	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ de degradação} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Calcular a percentagem de degradação para os frascos a_1, a_2 e a_3, respectivamente.

8. **OBSERVAÇÕES**

Deve anexar-se a curva de CBO em função do tempo, se existir.

▼B

Apêndice 1

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

OD: O oxigénio dissolvido (mg/l) é a concentração do oxigénio dissolvido numa amostra aquosa.

CBO: A carência bioquímica de oxigénio (g) é a quantidade de oxigénio consumida pelos microorganismos ao metabolizarem um composto de ensaio; também se exprime em g de oxigénio consumido por g de composto de ensaio (ver método C.5).

CQO: A carência química de oxigénio (g) é a quantidade de oxigénio consumida durante a oxidação de um composto de ensaio com dicromato ácido a quente; permite medir a quantidade de matérias oxidáveis presentes; também se exprime em g de oxigénio consumido por g de composto de ensaio (ver método C.6).

COD: O carbono orgânico dissolvido é o carbono orgânico presente na solução ou que passa através de um filtro de 0,45 microns ou que permanece no sobrenadante após centrifugação a 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g) durante 15 minutos.

CTeO: A carência teórica de oxigénio (mg) é a quantidade de oxigénio necessária para oxidar completamente uma substância química; calcula-se a partir da fórmula molecular (ver apêndice 2.2) e também se exprime em mg de oxigénio necessário por mg de composto de ensaio.

CO_2Te: O dióxido de carbono teórico (mg) é a quantidade calculada do dióxido de carbono que seria produzido a partir do teor de carbono medido ou conhecido do composto de ensaio, quando totalmente mineralizado; também se exprime em mg de dióxido de carbono libertado por mg de composto de ensaio.

COT: O carbono orgânico total de uma substância é a soma do carbono orgânico em solução e em suspensão.

CI: Carbono inorgânico.

CT: Carbono total, é a soma do carbono orgânico e inorgânico presente na amostra.

Biodegradação primária:

é a alteração da estrutura química de uma substância efectuada por acção biológica, tendo como resultado a perda de propriedades específicas dessa substância.

Biodegradação total (aeróbia):

é o nível de degradação alcançado quando o composto de ensaio é totalmente utilizado pelos microorganismos, produzindo dióxido de carbono, água, sais minerais e novos constituintes celulares microbianos (biomassa).

Facilmente biodegradável:

é uma classificação arbitrária para as substâncias químicas que passaram nos diversos ensaios específicos de despiste da biodegradabilidade total; dado que esses ensaios são tão exigentes, assumiu-se que essas substâncias serão biodegradadas fácil e completamente em ambiente aquático, sob condições aeróbias.

▼B

Intrinsecamente biodegradável:

é uma classificação de substâncias químicas relativamente às quais existem provas inequívocas de biodegradação (primária e total) num qualquer ensaio reconhecido de biodegradabilidade.

Tratáveis:

é a possibilidade de certos compostos serem removidos durante o tratamento biológico de águas residuais sem afectarem desfavoravelmente o funcionamento normal do processo de tratamento. De um modo geral, os compostos facilmente biodegradáveis são tratáveis mas o mesmo não sucede com todos os compostos intrinsecamente biodegradáveis. Também podem ser utilizados processos abióticos.

Tempo de latência:

é o tempo decorrido desde a inoculação, num ensaio de redução gradual, até que a percentagem de degradação tenha aumentado pelo menos até 10 %. O tempo de latência é normalmente bastante variável e pouco reprodutível.

Tempo de degradação:

é o tempo decorrido desde o final do tempo de latência até ao momento em que se atinge 90 % do nível máximo de degradação.

Período dos dez dias:

é o período de dez dias que se segue imediatamente a um nível de degradação de 10 %.

▼B

Apêndice 2

CÁLCULO E DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CARACTERÍSTICOS ADEQUADOS

Consoante o método escolhido, assim serão necessários determinados parâmetros característicos. Na secção seguinte descreve-se o modo de obter esses valores. A utilização desses parâmetros foi descrita em cada um dos métodos.

1. **Teor de carbono**

   Calcula-se o teor de carbono a partir da composição elementar conhecida ou determina-se por análise elementar da substância de ensaio.

2. **Carência teórica de oxigénio (CTeO)**

   A carência teórica de oxigénio (CTeO) pode ser calculada se for conhecida a composição elementar ou pode ser determinada por análise elementar. Para o seguinte composto genérico

   $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ sera:

   sem nitrificação,

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{\text{Massa molecular}}\ mg/mg$$

   ou, com nitrificação,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{\text{Massa molecular}}\ mg/mg$$

3. **Carência química de oxigénio (CQO)**

   A carência química de oxigénio (CQO) determina-se em conformidade com o método C.6.

4. **Carbono orgânico dissolvido (COD)**

   Por definição, o carbono orgânico dissolvido (COD) é o carbono orgânico de qualquer substância química ou de qualquer mistura em água que não é relido por um filtro de 0,45 microns.

   Retiram-se amostras dos recipientes de ensaio e filtram-se imediatamente no equipamento de filtração, utilizando um filtro de membrana adequado. Os primeiros 20 ml (esta quantidade pode ser reduzida quando se utilizam filtros pequenos) de filtrado são rejeitados. Retêm-se volumes de 10-20 ml ou inferiores, se forem injectados (volume dependente da quantidade necessária para o analisador de carbono), para análise de carbono. Determina-se a concentração de COD por meio de um analisador de carbono orgânico capaz de medir com exactidão uma concentração de carbono equivalente ou inferior a 10 % da concentração do COD inicial utilizada no ensaio.

   As amostras filtradas que não possam ser analisadas no próprio dia do trabalho podem ser conservadas num frigorífico à temperatura de 2-4 ºC, durante 48 horas, ou a temperaturas inferiores a - 18 ºC durante períodos mais longos.

   Observações:

   Os filtros de membrana são frequentemente impregnados com agentes tensioactivos para hidrofilização. Deste modo, o filtro pode conter até alguns mg de carbono orgânico solúvel que pode interferir com as determinações de biodegradabilidade. Os agentes tensioactivos e outros compostos orgânicos solúveis são removidos dos filtros por fervura em água desionisada durante três períodos de uma hora. Depois, os filtros podem ser mantidos em água durante uma semana. No caso de se utilizarem embalagens de filtros descartáveis, cada lote deve ser verificado para se confirmar que não liberta carbono orgânico solúvel.

▼B

A substância química de ensaio pode ser retida por adsorção, dependendo do tipo de filtro de membrana. Por esse motivo, é aconselhável garantir que a substância química de ensaio não é retida pelo filtro.

Em vez da filtração, pode recorrer-se a centrifugação a 40 000 $m.s^{-2}$ (4 000 g), durante 15 minutos, para diferenciar o COD do COT. Este método não é fiável para uma concentração inicial < 10 mg de COD/l uma vez que nem todas as bactérias são removidas, nem o carbono que faz parte do plasma bacteriano é redissolvido.

BIBLIOGRAFIA

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Oll. control Fed., Oxygen Demand, 1965, p. 65.

— Wagner, R. Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38409 Teil 41 — Deutsche Einhcitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.v.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), 169.

▼B

Apêndice 3

AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DE SUBSTÂNCIAS POUCO SOLÚVEIS

Nos ensaios de biodegradabilidade com substâncias pouco solúveis é necessário prestar especial atenção aos aspectos que se seguem.

Embora os líquidos homogéneos raramente apresentem problemas de amostragem, recomenda-se que se faça a homogeneização das substâncias sólidas por meios adequados, para evitar erros devidos a heterogeneidade. É necessário tomar cuidados especiais quando se pretendem amostras representativas de alguns miligramas, obtidas a partir de misturas de substâncias químicas ou de outras substâncias com grandes quantidades de impurezas.

Podem utilizar-se diversas formas de agitação durante os ensaios. É necessário ter a precaução de utilizar apenas a agitação suficiente para manter as substâncias químicas dispersas e para evitar sobreaquecimento, excessiva formação de espuma e forças de corte excessivas.

Pode ser utilizado um emulsionante que produza uma dispersão estável da substância química. Não deve ser tóxico para as bactérias e não deve ser biodegradado ou provocar espuma nas condições de ensaio.

Aos solventes, aplica-se o mesmo critério dos emulsionantes.

Não se recomenda a utilização de veículos sólidos para as substâncias de ensaio no estado sólido embora possam ser adequados para as substâncias oleosas.

No caso de se utilizarem substâncias auxiliares, tais como os emulsionantes, solventes e veículos, deve efectuar-se também uma experiência com um branco que contenha a substância auxiliar.

Pode ser utilizado qualquer um dos três ensaios respirométricos de CO_2, CBO e MITI, para estudar a biodegradabilidade de compostos pouco solúveis.

BIBLIOGRAFIA

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Gerike, P. The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

▼B

Apêndice 4

AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS QUE POSSAM SER TÓXICAS PARA O INÓCULO

Quando se submete uma substância química a um ensaio de biodegradabilidade fácil e esta não é, aparentemente, biodegradável, recomenda-se o procedimento seguinte, no caso de se pretender estabelecer uma distinção entre inibição e inércia (Reynolds et al., 1987).

Para os ensaios de toxicidade e de biodegradação devem ser utilizados inóculos semelhantes ou idênticos.

Para se avaliar a toxicidade de substâncias químicas de ensaio através de ensaios de biodegradabilidade fácil, sugere-se a aplicação de um ou de uma combinação do método de inibição da taxa respiratória das lamas (ensaio de inibição da respiração em lamas activadas — Dir 88/302/CEE), do CBO e/ou da inibição do crescimento.

No caso de se pretender evitar a inibição decorrente da toxicidade, sugere-se que as concentrações da substância de ensaio utilizadas no ensaio de biodegradabilidade fácil sejam inferiores a 1/10 dos valores CE_{50} (ou inferiores aos valores de CE_{20}), obtidos em ensaios de toxicidade. Não é provável que os compostos com um valor de CE_{50} superior a 300 mg/l possuam efeitos tóxicos em ensaios de biodegradabilidade imediata.

É provável que valores de CE_{50} inferiores a 20 mg/l causem grandes problemas na continuação dos testes. Devem ser utilizadas baixas concentrações de ensaio, sendo necessário recorrer ao ensaio rigoroso e sensível do frasco fechado ou utilizar material marcado com ^{14}C. Em alternativa, um inóculo aclimatizado pode permitir a utilização de concentrações mais elevadas da substância de ensaio. Contudo, neste último caso, perde-se o critério específico do ensaio de biodegradabilidade imediata.

BIBLIOGRAFIA

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 2259.

▼B

Apêndice 5

CORRECÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÉNIO DECORRENTE DA INTERFERÊNCIA POR NITRIFICAÇÃO

Os erros provocados por não se considerar a nitrificação na avaliação da biodegradabilidade das substâncias de ensaio que não contêm azoto através do consumo de oxigénio são marginais (não superiores a 5 %), mesmo no caso de a oxidação do azoto do amónio do meio ocorrer irregularmente, tal como sucede em relação aos recipientes de ensaio e ao branco. Contudo, para as substâncias de ensaio que contêm azoto, podem surgir erros graves.

Se houver nitrificação mas esta não for completa, o consumo de oxigénio pela mistura reaccional pode ser corrigido em função da quantidade de oxigénio utilizada para oxidar amónio em nitrito e nitrato, se as variações de concentração do nitrito e do nitrato durante a incubação forem determinadas tendo em conta as equações seguintes:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HC1 + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Globalmente é:

$$2\ NH_4C1 + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HC1 + 2\ H_2O \quad (3)$$

A partir da equação (1) verifica-se que o consumo de oxigénio por cada 28 g de azoto contido no cloreto de amónio (NH_4C1) oxidado a nitrito é 96 g, isto é, um factor de 3,43 (96/28). De modo idêntico, a partir da equação (3), verifica-se que o consumo de oxigénio por cada 28 g de azoto oxidado a nitrato é 128 g, isto é, traduz-se por um factor de 4,57 (128/28).

Uma vez que as reacções são sequenciais, sendo provocadas por espécies características e diferentes de bactérias, é possível que a concentração de nitrito aumente ou diminua; neste último caso, formar-se-ia uma concentração equivalente de nitrato. Deste modo, o oxigénio consumido na formação de nitrato é o acréscimo da concentração de nitrato multiplicado por 4,57, ao passo que o oxigénio associado à formação de nitrito é o acréscimo da concentração de nitrito multiplicado por 3,43 ou, se houver diminuição da sua concentração, a perda de oxigénio é o decréscimo de concentração multiplicado por - 3,43.

Dito de outro modo:

O_2 consumido na formação de nitrato = 4,57 × acréscimo na concentração de nitrato-N (4)

e

O_2 consumido na formação de nitrito = 3,43 × acréscimo na concentração de nitrito-N (5)

e

perda de O_2 por reacção com nitrito = ± 3,43 × acréscimo na concentração de nitrito-N (6)

pelo que consumo de

O_2 devido à nitrificação = - 3,43 × variação da concentração de nitrito-N + 4,57 × acréscimo na concentração de nitrato-N (7)

e, portanto, consumo de

O_2 devido a oxidação de C = consumo total observado — consumo devido à nitrificação (8)

Em alternativa, se apenas se determinar o azoto oxidado total, o consumo de oxigénio devido à nitrificação pode considerar-se igual, em primeira aproximação, a 4,57 × acréscimo do azoto oxidado.

O valor corrigido em função do consumo de oxigénio provocado pela oxidação do carbono é então comparado com o valor $CTeO_{NH4}$, conforme foi calculado no apêndice 2.

▼B

C.5. DEGRADAÇÃO — CARÊNCIA BIOQUÍMICA DE OXIGÉNIO

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo deste método consiste em medir a carência bioquímica de oxigénio (CBO) de substâncias orgânicas sólidas ou líquidas.

Os dados elaborados com este ensaio relacionam-se com os compostos solúveis em água; todavia, em princípio pelo menos, é possível ensaiar também compostos voláteis e compostos de fraca solubilidade em água.

O método aplica-se apenas aos materiais de ensaio orgânicos que não sejam inibidores das bactérias nas concentrações utilizadas no ensaio. No caso de o material de ensaio não ser solúvel para valores da concentração de ensaio, será necessário recorrer a acções especiais tais como a dispersão ultra-sónica para se conseguir uma boa dispersão do material de ensaio.

A informação sobre a toxicidade do composto químico pode ser útil para a interpretação de resultados insuficientes e para a selecção das concentrações de ensaio apropriadas.

1.2. DEFINIÇÃO E UNIDADES

Define-se a CBO como sendo a massa de oxigénio dissolvido necessária para o processo de oxidação bioquímica de um volume específico de solução da substância sob as condições prescritas.

Os resultados exprimem-se em gramas de CBO por grama de substância ensaiada.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

É desejável a utilização de uma substância de referência adequada para verificação da actividade do inóculo.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Inocula-se com microorganismos uma quantidade predeterminada da substância dissolvida ou dispersa num meio adequado e bem arejado e depois faz-se a incubação ao abrigo de luz e a uma temperatura ambiente previamente definida e constante.

Determina-se a CBO pela diferença entre o teor em oxigénio dissolvido no início e no termo do ensaio. A duração do ensaio deve ser de pelo menos 5 dias e não deve exceder 28 dias.

Numa experiência paralela deve efectuar-se um ensaio em branco sem conter qualquer substância de ensaio.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

A determinação da CBO não pode ser considerada uma determinação válida da biodegradabilidade de uma substância. Este ensaio apenas pode ser considerado como um ensaio de pesquisa preliminar.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Prepara-se uma solução ou dispersão preliminar da substância para se obter uma concentração da CBO compatível com o método utilizado. Determina-se depois a CBO utilizando qualquer método adequado nacional ou internacionalmente normalizado.

▼B

2. **RESULTADOS E AVALIAÇÃO**

Calcula-se a CBO existente na solução preliminar de acordo com o método normalizado seleccionado e converte-se em gramas de CBO por grama de substância ensaiada.

3. **RELATÓRIO**

O método utilizado deverá ser especificado.

O valor da carência bioquímica de oxigénio deverá ser uma média de pelo menos três medições válidas.

Todas as informações e observações relevantes para a interpretação dos resultados devem ser descritas, especialmente no que diz respeito a impurezas, estado físico, efeitos tóxicos e composição inerente da substância, que possa afectar os resultados.

Deve anotar-se a utilização de um aditivo para inibir a nitrificação biológica.

4. REFERÊNCIAS

Enumeração de métodos normalizados, por exemplo:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. **DEGRADAÇÃO — CARÊNCIA QUÍMICA DE OXIGÉNIO**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo deste método consiste em medir a carência química de oxigénio (CQO) de substâncias orgânicas sólidas ou líquidas por um processo arbitrário normalizado, sob condições laboratoriais previamente estabelecidas.

A informação sobre a fórmula da substância será útil para efectuar este ensaio e para interpretar os resultados obtidos (por exemplo, sais de halogéneos, sais ferrosos de compostos orgânicos, compostos organoclorados).

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

A carência química de oxigénio é uma medida da oxidabilidade de uma substância, e exprime-se pela quantidade equivalente de oxigénio de um reagente oxidante, consumido pela substância, sob condições laboratoriais previamente determinadas.

Exprime-se o resultado em gramas de CQO por grama da substância ensaiada.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Não é necessário utilizar substâncias de referência em todos os casos quando se investiga uma substância nova. Elas deverão servir essencialmente para calibrar o método de vez em quando e para permitir a comparação dos resultados quando se aplicar outro método.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Utilizando dicromato de potássio em ácido sulfúrico concentrado e utilizando sulfato de prata como catalisador, oxida-se uma quantidade predeterminada da substância, dissolvida ou dispersa em água, e levada a refluxo, durante duas horas. Determina-se o dicromato residual por um processo de titulação com um padrão de sulfato de amónio ferroso.

No caso das substâncias que contêm cloro, adiciona-se sulfato mercúrico ([1]) para reduzir a interferência.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Devido ao processo arbitrário de determinação, o valor da CQO constitui um «indicador de oxidabilidade» e como tal utiliza-se como um método prático para a medição de matéria orgânica.

Os cloretos podem interferir com este ensaio; a redução inorgânica ou os agentes oxidantes podem interferir também com a determinação da CQO.

Alguns compostos cíclicos e muitas substâncias voláteis (por exemplo, os ácidos gordos de baixo peso molecular) não são oxidados totalmente neste ensaio.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Prepara-se uma solução ou dispersão preliminar da substância de ensaio para se obter uma CQO entre 250 e 600 mg por litro.

([1]) Após a utilização, as soluções que contêm sais de mercúrio deverão ser tratadas para evitar a contaminação do ambiente com mercúrio.

▼B

Anotações:

No caso das substâncias fracamente solúveis ou não dispersíveis, pode pesar-se uma quantidade da substância finamente pulverizada ou da substância líquida, correspondente a cerca de 5 mg da CQO, e depois coloca-se no aparelho experimental com água.

A carência química de oxigénio (CQO) é determinada frequente e especialmente no caso das substâncias fracamente solúveis, recorrendo às vantagens de uma variante do método, isto é, num sistema fechado com um igualizador de pressão (H. Kelkenberg, 1975). De acordo com esta modificação, é possível quantificar frequentemente com sucesso os compostos para os quais as determinações são muito difíceis pelo método convencional (por exemplo, o ácido acético). Contudo, o método fracassa também no caso da piridina. Se a concentração do dicromato de potássio, conforme prescrito na referência (1), aumentar para 0,25 N (0,0416 M), fica facilitada a pesagem directa de 5-10 mg de substância o que é essencial para a determinação da CQO de substâncias fracamente solúveis em água (referência 2).

Caso contrário, determina-se depois a CQO utilizando qualquer método adequado nacional ou internacionalmente normalizado.

2. **RESULTADOS E AVALIAÇÃO**

Calcula-se a CQO existente no balão de ensaio experimental utilizando o método normalizado seleccionado e depois converte-se em gramas de CQO por grama de substância ensaiada.

3. **RELATÓRIO**

Deverá especificar-se o método de referência utilizado.

A carência química de oxigénio deverá ser a média de pelo menos três medições. Toda a informação e anotações relevantes para a interpretação dos resultados deverão ser descritas, especialmente no que diz respeito a impurezas, estado físico e propriedades inerentes à substância (se forem conhecidas) que possam afectar os resultados.

Deve ser mencionada a utilização de sulfato mercúrico para minimizar a interferência dos cloretos.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Kelkenberg, H. (1975). Z. von Wasser und Abwasserforscnung, 8, 146.

(2) Gerike, P. (1984). The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 13, 169.

Enumeração de métodos normalizados, por exemplo:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN 0 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. DEGRADAÇÃO — DEGRADAÇÃO ABIÓTICA: HIDRÓLISE EM FUNÇÃO DO PH

1. MÉTODO

O presente método de ensaio é equivalente ao método OECD TG 111 (2004).

1.1. INTRODUÇÃO

As substâncias químicas podem afluir às águas de superfície por vias tais como a aplicação directa, a dispersão de pulverizados, a escorrência, a drenagem, a eliminação de resíduos, os efluentes industriais, domésticos e agrícolas e a deposição atmosférica, podendo ser transformados nas referidas águas por processos químicos (por exemplo hidrólise ou oxidação), fotoquímicos e/ou microbianos. A presente directriz descreve um método de ensaio laboratorial com o objectivo de avaliar as transformações por hidrólise abiótica de substâncias químicas em sistemas aquáticos com valores de pH correntes (pH 4 - 9) e baseia-se nas directrizes em vigor (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

O objectivo dos ensaios consiste em determinar (i) a velocidade de hidrólise da substância em estudo em função do pH e (ii) a identidade ou natureza, bem como as velocidades de formação e transformação, dos produtos de hidrólise a que os organismos possam ser expostos. Os estudos em causa podem ser necessários no caso de substâncias químicas directamente aplicadas na água ou que possam afectar o ambiente pelas outras vias atrás referidas.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

Ver o apêndice 2.

1.3. APLICABILIDADE DO MÉTODO

O método é aplicável, de forma geral, a substâncias químicas (marcadas ou não) para as quais exista um método analítico de precisão e sensibilidade suficientes. É aplicável a compostos ligeiramente voláteis e não voláteis de solubilidade suficiente em água, não devendo ser aplicado a substâncias altamente voláteis em meio aquoso (nomeadamente fumigantes e solventes orgânicos), dado que as mesmas não podem ser mantidas em solução nas condições experimentais do ensaio. A realização do ensaio com substâncias de solubilidade mínima em água poderá revelar-se difícil (8).

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Procede-se à adição da substância em estudo a soluções-tampão aquosas estéreis de diversos valores de pH (pH 4, 7 e 9), seguida de incubação ao abrigo da luz em condições laboratoriais controladas (a temperaturas constantes). Após intervalos de tempo adequados, analisam-se as soluções-tampão para a pesquisa da substância em estudo, bem como de produtos de hidrólise. O recurso a substâncias de ensaio marcadas (por exemplo com ^{14}C) permite obter um balanço de massas com maior facilidade.

O método de ensaio é concebido numa forma progressiva que se ilustra e elucida no apêndice 1. Cada nível é condicionado pelos resultados do nível anterior.

▼B

1.5. INFORMAÇÕES SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

As substâncias em estudo a utilizar para a determinação da velocidade de hidrólise podem ser marcadas ou não. As substâncias marcadas são especialmente úteis para o estudo do mecanismo da hidrólise e para o estabelecimento do balanço de massas; todavia, em alguns casos especiais, a marcação poderá não ser totalmente indispensável. Recomenda-se a marcação com ^{14}C, embora o recurso a outros isótopos, nomeadamente ^{13}C, ^{15}N e ^{3}H, possa revelar-se também útil. Na medida do possível, a marcação deve ser posicionada na parte ou nas partes mais estáveis da molécula. Por exemplo, se a substância em causa contiver um anel, é necessária a marcação do mesmo; se a substância contiver dois ou mais anéis, poderá ser necessário efectuar ensaios separados para avaliar o comportamento de cada anel marcado e obter informações adequadas sobre a formação dos produtos de hidrólise. A substância em estudo deve ter uma pureza mínima de 95 %.

Antes da realização de um ensaio de hidrólise, devem conhecer-se os seguintes dados sobre a substância em estudo:

a) Solubilidade em água [método de ensaio A.6];

b) Solubilidade em solventes orgânicos;

c) Pressão de vapor [método de ensaio A.4] e/ou constante de Henry;

d) Coeficiente de partição n-octanol/água [método de ensaio A.8];

e) Constante de dissociação (pK_a) [Directriz OECD 112] (9);

f) Velocidade de fototransformação directa e indirecta em água, se adequado.

Devem existir métodos analíticos para a quantificação da substância em estudo e, caso seja relevante, para a identificação e quantificação dos produtos de hidrólise em solução aquosa (ver também a secção 1.7.2).

1.6. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Sempre que possível, deverão utilizar-se substâncias de referência para a identificação e quantificação dos produtos de hidrólise por métodos espectroscópicos e cromatográficos ou outros métodos de sensibilidade adequada.

1.7. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.7.1. **Recuperação**

A análise, pelo menos em duplicado, das soluções-tampão ou extractos das mesmas imediatamente após a adição da substância em estudo fornece uma primeira indicação da repetibilidade do método analítico e da uniformidade do procedimento de adição da substância. Nas fases posteriores dos ensaios, as recuperações decorrem dos balanços de massas (em caso de utilização de substâncias marcadas). As recuperações deverão situar-se entre 90 % e 110 %, para substâncias marcadas ou não (7). Caso seja tecnicamente difícil atingir este intervalo, é aceitável uma recuperação de 70 % no caso de substâncias não marcadas, devendo, contudo, apresentar-se uma justificação.

▼B

1.7.2. **Repetibilidade e sensibilidade do método analítico**

A repetibilidade do(s) método(s) analítico(s) utilizado(s) para a quantificação da substância em estudo e, posteriormente, dos produtos de hidrólise pode ser comprovada pela análise em duplicado das mesmas soluções-tampão (ou de extractos das mesmas) após a formação de uma quantidade suficiente de produtos de hidrólise para quantificação.

O método analítico deve ser suficientemente sensível para quantificar a substância em estudo em concentrações da ordem de 10 % ou menos da concentração inicial. Se pertinente, os métodos analíticos deverão também ser suficientemente sensíveis para quantificar quaisquer produtos de hidrólise que constituam 10 % ou mais da quantidade adicionada (em qualquer fase do ensaio) até 25 % ou menos da concentração máxima.

1.7.3. **Intervalos de confiança para os dados de cinética da hidrólise**

Os intervalos de confiança devem ser objecto de tratamento informático de forma a obter os coeficientes de regressão, as constantes de velocidade, os tempos de semitransformação e quaisquer outros parâmetros cinéticos (por exemplo, DT50).

1.8. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.8.1. **Equipamento e aparelhagem**

O ensaio deve ser realizado em recipientes de vidro (tubos de ensaio ou recipientes pequenos) ao abrigo da luz e em condições estéreis, se necessário, excepto se existirem dados (por exemplo, coeficiente de partição n-octanol-água) que indiquem a possibilidade de a substância em estudo aderir ao vidro. Nesse caso, deverá estudar-se a possibilidade de utilizar materiais alternativos (nomeadamente Teflon). A adesão da substância ao vidro poderá também ser minimizada por recurso a um ou mais dos seguintes métodos:

— determinação da massa de substância em estudo e dos produtos de hidrólise aderentes ao recipiente de ensaio,

— uso de um banho de ultra-sons,

— lavagem com solvente do material de vidro com após a análise de cada amostra,

— uso de produtos na forma de formulações,

— aumento da quantidade de co-solvente utilizada para a adição da substância em estudo ao sistema; em caso de utilização de um co-solvente, este não deverá hidrolisar a substância em estudo.

Em geral, é necessário utilizar agitadores mecânicos de banhos-maria com controlo de temperatura ou incubadores com controlo termostático para a incubação das soluções em estudo.

O equipamento de laboratório de uso corrente deverá incluir, nomeadamente, o seguinte:

— medidor de pH,

▼B

— instrumentos de análise tais como aparelhos de GC, HPLC, TLC, incluindo sistemas adequados de detecção para a análise de substâncias marcadas ou não com radioisótopos ou pelo método de diluição isotópica inversa,

— instrumentos de identificação (MS, GC-MS, HPLC-MS, RMN, etc.),

— contador de cintilação líquida,

— ampolas de decantação para extracção líquido-líquido,

— instrumentos para a concentração das soluções e extractos (por exemplo, evaporador rotativo),

— dispositivo de controlo da temperatura (por exemplo, banho-maria).

Os reagentes incluem, nomeadamente:

— solventes orgânicos de qualidade analítica (hexano, diclorometano, etc.),

— líquido de cintilação,

— soluções-tampão (ver secção 1.8.3).

O material de vidro, a água de qualidade analítica e as soluções-tampão a utilizar nos ensaios de hidrólise devem ser esterilizados.

1.8.2. **Adição da substância em estudo**

A substância em estudo, na forma de solução aquosa, é adicionada às diversas soluções-tampão (ver apêndice 3). Caso tal seja necessário a uma dissolução adequada, é permitida a utilização de pequenas quantidades de solventes miscíveis com água (tais como acetonitrilo, acetona e etanol) para a adição e difusão da substância em estudo, que não devem contudo exceder, em geral, 1 % (v/v). O recurso a uma concentração mais elevada de solvente (por exemplo, no caso de a substância em estudo ter uma solubilidade reduzida) apenas é permitida se for provado que o solvente não tem efeitos na hidrólise da substância em estudo.

Não se recomenda o uso rotineiro de produtos na forma de formulações, dado que não é de excluir a possibilidade de os ingredientes da formulação interferirem no processo de hidrólise. A utilização dos produtos em causa poderá contudo ser uma alternativa adequada no caso de substâncias em estudo de solubilidade reduzida em água ou que adiram ao vidro (ver a secção 1.8.1).

Deve usar-se uma concentração única da substância em estudo, que não deverá exceder 0,01 M ou metade da concentração de saturação (ver o apêndice 1).

▼B

1.8.3. **Soluções-tampão**

O ensaio de hidrólise deverá ser realizado a pH 4, 7 e 9. Para tal, devem preparar-se soluções-tampão por recurso a produtos com pureza de reagente e água. O apêndice 3 apresenta alguns sistemas-tampão úteis. De referir que o sistema-tampão utilizado poderá influenciar a velocidade de hidrólise, caso em que deverá utilizar-se um sistema-tampão alternativo ([1]).

O pH de cada solução-tampão deverá ser comprovado com o auxílio de um medidor de pH com uma precisão mínima de 0,1, à temperatura requerida.

1.8.4. **Condições de ensaio**

1.8.4.1. *Temperatura*

Os ensaios de hidrólise devem ser realizados a temperaturas constantes. Para fins de extrapolação, é importante manter a temperatura com uma aproximação mínima de ± 0,5 ºC.

Caso o comportamento hidrolítico da substância em estudo seja desconhecido, deverá proceder-se a um ensaio preliminar (nível 1) à temperatura de 50 ºC. Devem realizar-se ensaios cinéticos de nível superior a, pelo menos, três temperaturas (incluindo o ensaio a 50 ºC), excepto se o ensaio de nível 1 tiver demonstrado a estabilidade hidrolítica da substância em estudo. Sugere-se uma gama de temperaturas compreendida entre 10 e 70 ºC (em princípio, deverá realizar-se pelo menos um ensaio a uma temperatura inferior a 25 ºC), que abrange a temperatura de referência de 25 ºC e a maioria das temperaturas registadas em campo.

1.8.4.2. *Luz e oxigénio*

Nos ensaios de hidrólise deverão utilizar-se quaisquer métodos adequados para evitar os efeitos fotolíticos. Deve recorrer-se a todas as medidas adequadas para evitar a oxigenação (por exemplo, fazendo borbulhar hélio, azoto ou árgon durante 5 minutos antes de preparar a solução).

1.8.4.3. *Duração do ensaio*

O ensaio preliminar deverá ser realizado em 5 dias; os ensaios de nível superior deverão ser realizados até se verificar a hidrólise de 90 % da substância em estudo ou em 30 dias, consoante o que ocorrer primeiro.

1.8.5. **Realização do ensaio**

1.8.5.1. *Ensaio preliminar (Nível 1)*

O ensaio preliminar é realizado a 50 ± 0,5 ºC e pH 4,0, 7,0 e 9,0. Se, após 5 dias, a extensão da hidrólise não exceder 10 % ($t_{0,525\ ^{o}C}$ > 1 ano), a substância em estudo é considerada hidroliticamente estável, não sendo necessário proceder a ensaios complementares. Se for conhecida a instabilidade da substância a temperaturas relevantes no plano ambiental ([2]), não é necessário realizar o ensaio preliminar. O método analítico deverá ser suficientemente preciso e sensível para detectar uma redução de 10 % da concentração inicial.

([1]) Mabey e Mill recomendam o uso de tampões de borato ou acetato em vez de fosfato (11).

([2]) A informação em causa pode provir de outras fontes, nomeadamente dados sobre a hidrólise de compostos estruturalmente afins obtidos na literatura ou dados de outros ensaios preliminares de hidrólise à escala semiquantitativa com a substância em estudo num estádio de desenvolvimento mais elementar.

▼B

1.8.5.2. *Hidrólise de substâncias instáveis (Nível 2)*

O ensaio de nível superior (ensaio avançado) deverá realizar-se a valores de pH aos quais a substância em estudo se revelou instável no ensaio preliminar. As soluções tamponadas da substância em estudo devem ser termostatadas às temperaturas escolhidas. No caso da pesquisa de reacções de primeira ordem, cada solução deverá ser analisada a intervalos de tempo que permitam obter, no mínimo, seis valores (pontos) compreendidos, em princípio, entre 10 % e 90 % da hidrólise da substância em estudo. Remover as amostras individuais múltiplas (deve proceder-se, no mínimo, à análise de duplicados em recipientes de reacção separados) e analisar o conteúdo correspondente a cada um dos seis tempos de reacção (desta forma, obtêm-se, no mínimo, doze pontos). Considera-se inadequada a utilização de uma solução-mãe da qual se retiram alíquotas da solução em estudo em cada intervalo de amostragem, dado que não permite a análise da variabilidade dos dados e pode levar à contaminação da solução em estudo. Devem realizar-se ensaios de confirmação da esterilidade no final do ensaio de nível superior (90 % de hidrólise ou 30 dias). Todavia, estes ensaios não são necessários se não tiver sido observada qualquer transformação.

1.8.5.3. *Identificação dos produtos de hidrólise (Nível 3)*

Todos os principais produtos de hidrólise, designadamente os que representam um teor igual ou superior a 10 % da dose adicionada, devem ser identificados por métodos analíticos adequados.

1.8.5.4. *Ensaios facultativos*

As substâncias hidroliticamente instáveis poderão necessitar de ensaios complementares a valores de pH diversos de 4, 7 e 9. Para fins fisiológicos, por exemplo, poderá ser necessário efectuar um ensaio em condições mais ácidas (por exemplo, pH 1,2) a uma única temperatura fisiologicamente relevante (37 °C).

2. **DADOS**

Se pertinente, as quantidades de substâncias em estudo e produtos de hidrólise devem ser expressas em percentagem da concentração inicial adicionada e, se adequado, em mg/l, para cada intervalo de amostragem, cada pH e cada temperatura de ensaio. Além disso, no caso da utilização de uma substância marcada, deve apresentar-se um balanço de massa expresso em percentagem da concentração inicial adicionada.

Deve apresentar-se uma representação gráfica dos logaritmos das concentrações da substância em estudo em função do tempo. Os principais produtos de hidrólise (os que representem, pelo menos, 10 % da dose adicionada) devem ser identificados, procedendo-se à representação gráfica dos logaritmos das suas concentrações em função do tempo tal como no caso da substância de origem, de forma a evidenciar as suas velocidades de formação e transformação.

▼B

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

É possível efectuar determinações mais precisas dos tempos de semitransformação ou dos parâmetros DT_{50} por recurso a cálculos com modelos cinéticos adequados. Devem comunicar-se, para cada pH e temperatura, os tempos de semitransformação e/ou os parâmetros DT_{50} (incluindo os limites de confiança), juntamente com uma descrição domodelo utilizado, a ordem cinética e o coeficiente de determinação (r^2). Se adequado, os cálculos deverão também abranger os produtos de hidrólise.

No caso do estudo de velocidades de reacção efectuados a temperaturas diferentes, as constantes de hidrólise de pseudoprimeira ordem (k_{obs}) devem ser descritas em função da temperatura. Os cálculos deverão basear-se, por um lado, na decomposição de k_{obs} em constantes de velocidade de hidrólise catalisada em meio ácido, neutro ou básico (k_H, k_{neutro} e k_{OH} respectivamente) e, por outro, na equação de Arrhenius:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutro} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i=H,neutro,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

em que A_i e B_i são as constantes de regressão decorrentes, respectivamente, do declive e da ordenada na origem da linha mais adequada obtida por regressão linear ln k_i em função do inverso da temperatura absoluta, expressa em Kelvin (T). A aplicação da equação de Arrhenius à hidrólise catalisada em meio ácido, neutro e básico permite calcular as constantes de velocidade de pseudoprimeira ordem e, consequentemente, as meias vidas, para temperaturas às quais a determinação directa da constante de velocidade não é viável na prática (10).

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A maioria das reacções de hidrólise apresenta uma cinética aparente de primeira ordem, pelo que os tempos de semitransformação são independentes da concentração (ver a equação 4 do apêndice 2). Tal facto permite, em geral, a extrapolação dos resultados laboratoriais determinados com concentrações de 10^{-2}-10^{-3} M às condições ambientais (< 10^{-6} M) (10). Mabey e Mill (11) comunicaram vários exemplos de bom acordo entre as velocidades de hidrólise de diversas substâncias químicas determinadas em águas puras e naturais, a pH e temperaturas bem determinados.

3. **RELATÓRIOS**

3.1. RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deverá incluir, no mínimo, as seguintes informações:

Substância em estudo:

— denominação comum, denominação química, número CAS, fórmula estrutural (com indicação da posição marcada, caso se utilizem radioisótopos) e propriedades físico-químicas relevantes (ver a secção 1.5),

— pureza da substância (presença de impurezas),

— pureza declarada da substância marcada e respectiva actividade molar (se pertinente).

▼B

— Soluções-tampão:

— datas e pormenores de preparação,

— tampões e água utilizados,

— molaridade e pH das soluções-tampão.

Condições de ensaio:

— data da realização dos estudos,

— quantidade de substância em estudo adicionada,

— método e solventes (tipo e quantidade) utilizados para a adição da substância em estudo,

— volume de soluções tamponadas da substância em estudo incubadas,

— descrição do sistema de incubação utilizado,

— pH e temperatura durante o estudo,

— cronologia da colheita de amostras,

— método(s) de extracção,

— métodos de quantificação e identificação da substância em estudo e dos seus produtos de hidrólise nas soluções-tampão,

— número de amostras múltiplas.

Resultados:

— repetibilidade e sensibilidade dos métodos de análise utilizados,

— recuperações (apresentam-se na secção 1.7.1 os valores percentuais relativos a um ensaio válido),

— dados e médias respeitantes às amostras múltiplas, apresentados na forma de quadros,

— balanço de massas durante e no final do estudo (caso se utilize uma substância marcada),

— resultados do ensaio preliminar,

— discussão e interpretação dos resultados,

— dados e valores originais.

As informações que se seguem apenas são necessárias caso se determine a velocidade de hidrólise:

— representação gráfica das concentrações da substância em estudo e, se pertinente, dos produtos de hidrólise, em função do tempo, a cada pH e temperatura,

— tabelas de resultados da equação de Arrhenius à temperatura de 20 ºC/25 ºC,

— especificando o pH, a constante de velocidade [h^{-1} ou dia^{-1}], o tempo de semitransformação ou o DT50, as temperaturas [ºC], incluindo os limites de confiança e os coeficientes de correlação (r^2), ou dados similares,

— mecanismo de hidrólise proposto.

▼B

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adoptado em 12 de Maio de 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 ºC. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) União Europeia (UE) (1995). Directiva 95/36/CE da Comissão que altera a Directiva 91/414/CEE relativa à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. Anexo V: destino e comportamento no ambiente.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (Outubro de 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No 23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

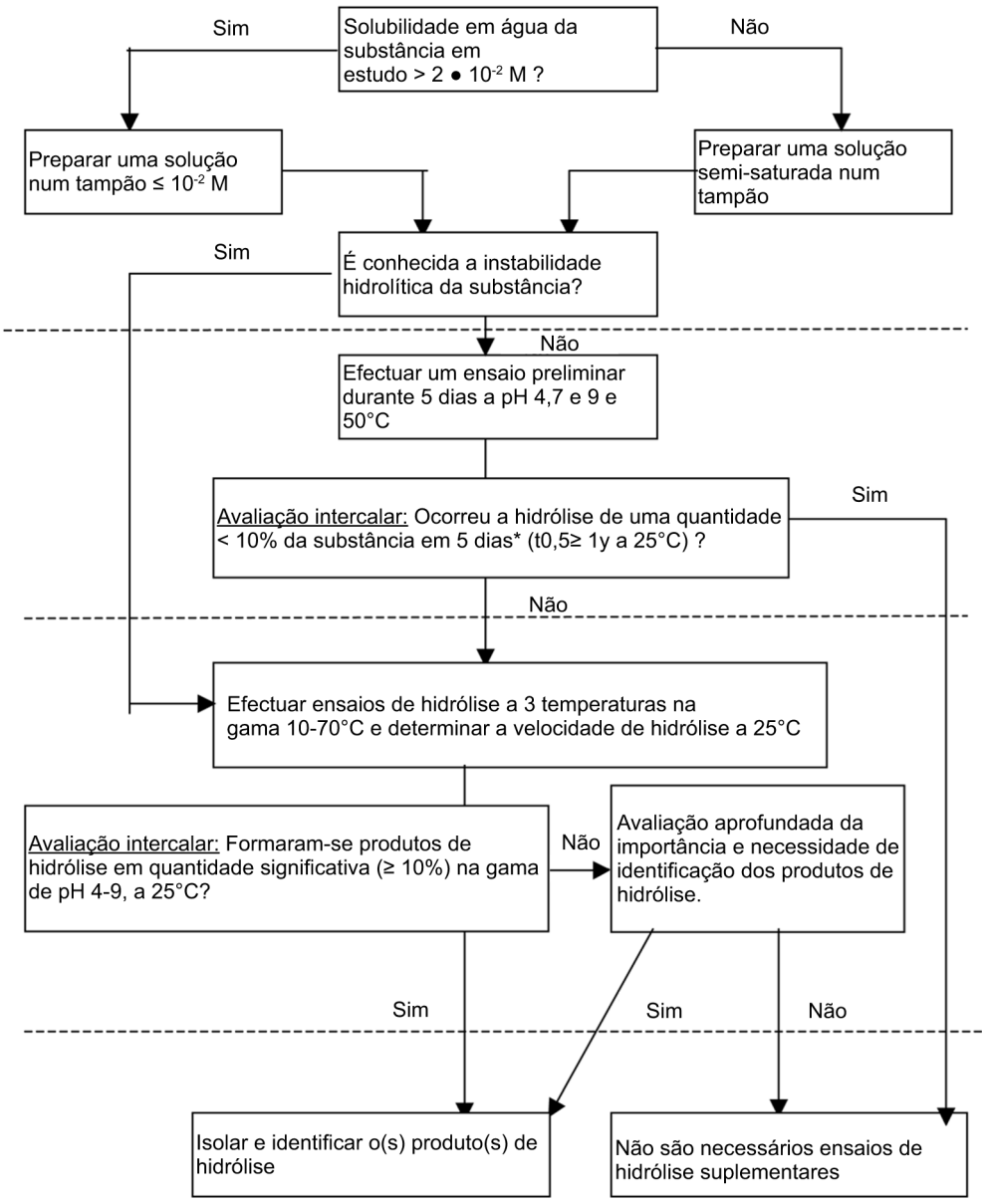
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models (texto de uma exposição oral no 14.º Encontro Anual da *Society of Environmental Toxicology and Chemistry,* Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

Apêndice 1

Representação esquemática do ensaio de hidrólise progressivo



* 10 % de hidrólise da substância em estudo a 50 °C corresponde a um tempo de semi-transformação de cerca de 30 dias, equivalente a cerca de 1 ano a 25°C.

▼B

Apêndice 2

Definições e unidades

Devem usar-se sistematicamente **unidades do Sistema Internacional (SI).**

Substância em estudo: substância de origem ou produtos de transformação relevantes.

Produtos de transformação: quaisquer substâncias resultantes da transformação biótica ou abiótica da substância em estudo.

Produtos de hidrólise: quaisquer substâncias resultantes de reacções de transformação hidrolítica da substância em estudo.

Hidrólise: reacção de uma substância em estudo RX com água, com troca do grupo X com um grupo OH:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

De forma simplificada, a velocidade de redução da concentração de RX é dada por

velocidade = k $[H_2O]$ [RX] reacção de segunda ordem

ou

velocidade = k [RX] reacção de primeira ordem

em função do passo determinante da velocidade. Uma vez que a água se encontra presente em grande excesso relativamente à substância em estudo, o tipo de reacção em causa é geralmente descrito como de pseudoprimeira ordem. A constante de velocidade observada é expressa do seguinte modo

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

e pode ser determinada por recurso à expressão (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

em que

t = tempo

C_o, C_t = concentrações de RX nos instantes 0 e t.

A constante tem dimensões de $(\text{tempo})^{-1}$; o tempo de semitransformação (tempo necessário para a reacção de 50 % da substância RX) é dada por

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Tempo de semitransformação: ($t_{0,5}$) tempo necessário à hidrólise de 50 % da substância em estudo, no caso de uma reacção com cinética de primeira ordem. É independente da concentração.

(*) Se a representação dos logaritmos das concentrações em função do tempo não for uma função linear (facto que traduz uma cinética de primeira ordem), o recurso à equação [3] não é adequado à determinação da constante de velocidade da hidrólise da substância em estudo.

▼B

DT_{50} (Tempo de semi-reacção): tempo necessário a uma redução de 50 % da concentração da substância em estudo. É diferente do tempo de semitransformação, $t_{0,5}$, se a reacção não apresentar uma cinética de primeira ordem.

Estimativa de k a uma temperatura diferente

Sempre que sejam conhecidas as constantes de velocidade a duas temperaturas, as constantes a outras temperaturas podem ser calculadas por recurso à equação de Arrhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ ou } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Por representação de ln k em função de 1/T obtém-se uma recta com declive -E/R

em que:

k = constante de velocidade, determinada a temperaturas diferentes

E = energia de activação [kJ/mol]

T = temperatura absoluta [K]

R = constante dos gases [8,314 J/mol.K]

A energia de activação foi calculada por análise da seguinte equação por regressão linear:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

em que: $T_2 > T_1$.

▼B

Apsêndice 3

Sistemas-tampão

A. **CLARK E LUBS:**

Misturas-tampão de CLARK e LUBS (*)

Composição	pH
0,2 N HCl E 0,2 N KCl A 20 ºC	
47,5 ml HC1 + 25 ml KC1 dil. para 100 ml	1,0
32,25 ml HC1 + 25 ml KC1 dil. para 100 ml	1,2
20,75 ml HC1 + 25 ml KC1 dil. para 100 ml	1,4
13,15 ml HC1 + 25 ml KC1 dil. para 100 ml	1,6
8,3 ml HC1 + 25 ml KC1 dil. para 100 ml	1,8
5,3 ml HC1 + 25 ml KC1 dil. para 100 ml	2,0
3,35 ml HC1 + 25 ml KC1 dil. para 100 ml	2,2
0,1 M biftalato de potássio + 0,1 N HC1 a 20 ºC	
46,70 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	3,8
0,1 M biftalato de potássio + 0,1 N NaOH a 20 ºC	
0,40 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	4,8

(*) Os valores de pH constantes dos quadros foram calculados com base em determinações potenciométricas, por recurso às equações-padrão de Sörensen (1909). Os valores de pH correspondentes são superiores em 0,04 aos valores constantes dos quadros.

▼B

Composição	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	6,0

0,1 M fosfato monopotássico + 0,1 N NaOH a 20 ºC	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	8,0
0,1 M H_3B0_3 em 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH a 20 ºC	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF AND VLEESCHHOUWER:**

Tampões de citrato de KOLTHOFF e VLEESCHHOUWER

Composição	pH
0,1 M citrato monopotássico e 0,1 N HCl a 18 ºC (*)	
49,7 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato dil. para 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato dil. para 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato dil. para 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato dil. para 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato dil. para 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato dil. para 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato dil. para 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato dil. para 100 ml	3,6
0,1 M citrato monopotássico e 0,1 N NaOH a 18 ºC (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	6,0

(*) Deve adicionar-se um pequeno cristal de timol ou de uma substância afim para evitar a formação de depósitos molds.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Misturas de boratos de SÖRENSEN

Composição		Sörensen 18 ºC	Walbum, pH a		
ml Borax	ml HC1/NaOH		10 ºC	40 ºC	70 ºC
0,05 M borax + 0,1 N HCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M borax + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Misturas de fosfatos de SÖRENSEN

Composição	pH
0,0667 M fosfato monopotássico + 0,0667 M fosfato dissódico a 20 ºC	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8. 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 apêndice) 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),

▼B

— 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 contém 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.

▼B

A substância deve ser ensaiada nas seguintes concentrações: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg substância/kg de substratode 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 $CL_{5()}$.

Mistura do substrato de base para o ensaio e da substância de ensaio

5empre 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 a 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.

▼B

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 7.º 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 apêndice) (pelo menos com 2 meses de vida e com clitelo), com peso húmido de 300 a 600 mg (ver método de reprodução em apêndice).

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),

▼B

— 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 urna 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. **REFERÊNCIAS**

(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 fur Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrens-vorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden», in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie,* ecomed. Landsberg, 1986.

▼B

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 ºC, 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 1.
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 taxionomistas 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.

▼B

C.9. **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 microorganismos 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 a 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 microorganismos.

▼B

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 referencia; 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, munida 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 ºC, 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).

▼B

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.

Acido 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, $NaH_2PO_4.2H_20$, 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.

▼B

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 ºC. 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.

▼B

As perdas devidas a 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 dietilcnoglicol 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.

▼B

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.

▼B

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 microorganismos 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, T*est 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 (JO L 251 de 19.9.1984, p. 1).

▼B

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.

▼B

Figura 1

Exemplos de curvas de biodegradação

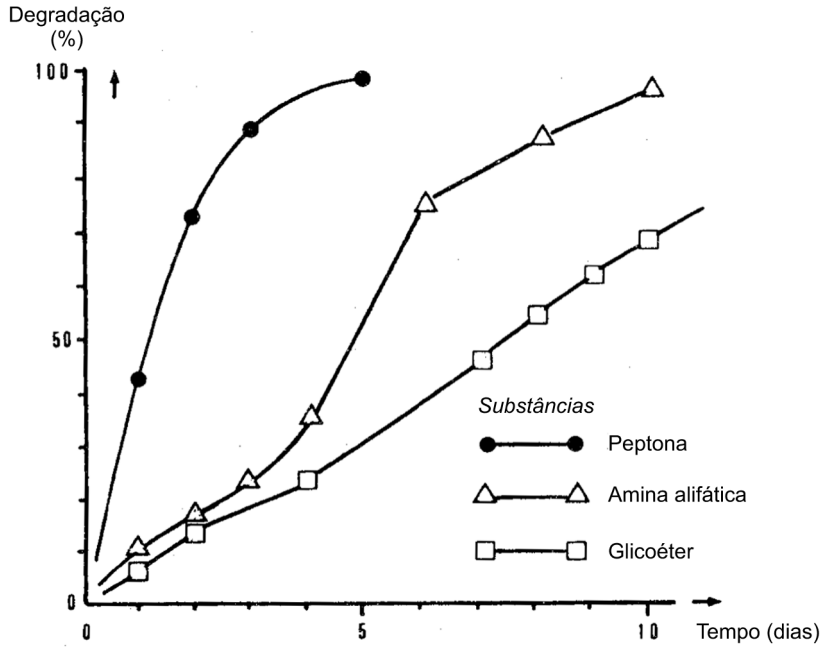
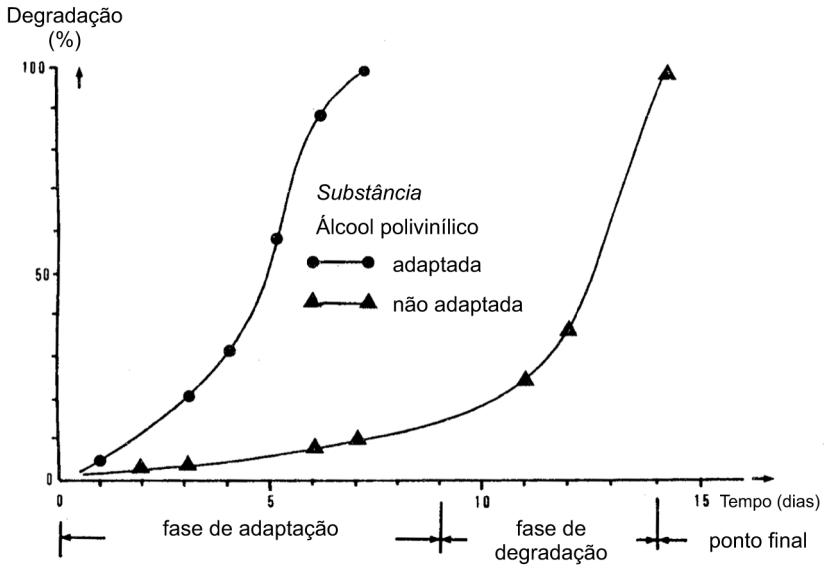


Figura 2

Exemplos de adaptação das lamas



▼M4

C.10. **ENSAIO DE SIMULAÇÃO DO TRATAMENTO AERÓBIO DE EFLUENTES C.10-A: UNIDADES DE LAMAS ATIVADAS — C.10-B BIOFILMES**

C.10-A: Unidades de lamas ativadas

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 303 da OCDE (2001). Na década de 1950, concluiu-se que os novos tensioativos causavam a formação excessiva de espuma nas estações de tratamento de águas residuais e nos cursos de água. Observou-se que não eram totalmente eliminados no tratamento aeróbio e que, em alguns casos, limitavam a remoção de outras matérias orgânicas. Este facto levou à realização de várias investigações sobre o modo como os tensioativos poderiam ser removidos das águas residuais e a compatibilidade dos novos produtos químicos produzidos pela indústria com o tratamento de águas residuais. Para este efeito, foram utilizados modelos de unidades que representavam os dois principais tipos de tratamento biológico aeróbio das águas residuais (lamas ativadas e filtração por percolação ou em leito percolador). Seria inviável e muito oneroso disseminar cada novo produto químico e monitorizar estações de tratamento em grande escala, mesmo a nível local.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Unidades de lamas ativadas

2. Estão descritos modelos de unidades de lamas ativadas de volume compreendido entre 300 ml e 2 000 ml. Alguns modelos, que constituem réplicas bastante fiéis de estações à escala real, possuem tanques de decantação a partir dos quais as lamas decantadas são bombeadas para um tanque de arejamento, enquanto outros, como o modelo Swisher (1), não possuem decantadores. As dimensões a adotar resultam de um compromisso; por um lado, devem ser suficientemente grandes para que as operações mecânicas sejam executadas de forma correta e para que o volume das amostras seja suficiente, sem afetar o funcionamento; por outro, o equipamento não deve ocupar demasiado espaço nem exigir uma quantidade excessiva de materiais.

3. As unidades de Husmann (2) e as unidades de vasos porosos (3)(4) constituem dois tipos de dispositivos utilizados em larga escala e de forma satisfatória, tendo sido os primeiros utilizados no estudo dos tensioativos; estas unidades são descritas no presente método de ensaio. Foram também utilizadas com resultados satisfatórios outras unidades, como, por exemplo, a de Eckenfelder (5). Atendendo ao custo relativamente elevado e ao esforço apreciável que o recurso ao presente ensaio de simulação implica, foram estudados em paralelo ensaios de rastreio mais simples e menos onerosos, que constam do capítulo C.4 A-F do presente anexo (6). A experiência adquirida com muitos tensioativos e outros produtos químicos demonstrou que aqueles que são aprovados nos ensaios de rastreio (facilmente biodegradáveis) se degradaram também no ensaio de simulação. Alguns produtos químicos que não foram aprovados nos ensaios de rastreio foram-no nos ensaios de biodegradabilidade inerente — capítulos C.12 (7) e C.19 (8), do presente anexo —, mas apenas alguns destes últimos se degradaram no ensaio de simulação; os produtos químicos não aprovados nos ensaios de biodegradabilidade inerente não se degradaram nos ensaios de simulação (9)(10)(11).

4. Para alguns fins, são suficientes os ensaios de simulação efetuados com uma única combinação condições experimentais; os resultados são expressos em percentagem de remoção do produto químico em estudo ou do carbono orgânico dissolvido (COD). O presente método apresenta uma descrição de um desses ensaios. No entanto, contrariamente à versão anterior deste capítulo, que descrevia apenas um tipo de dispositivo para o tratamento de águas residuais sintéticas em unidades interligadas, utilizando um método

▼M4

relativamente rudimentar de rejeição das lamas, o presente texto contempla diversas variantes. Descreve-se alternativas para o tipo de dispositivo, o modo de funcionamento, as águas residuais e a rejeição das lamas. O texto segue de perto a norma ISO 11733 (12), que foi objeto de análise cuidadosa durante a preparação deste método; porém, este não foi ainda sujeito a um ensaio interlaboratorial.

5. Para outros fins, é necessário conhecer de forma mais precisa a concentração do produto químico em estudo no efluente, o que implica o recurso a um método mais elaborado. O caudal da rejeição de lamas, por exemplo, deve ser controlado de forma mais precisa ao logo de cada dia e do período do ensaio, sendo necessário que as unidades funcionem com vários caudais de rejeição. No caso de um método mais elaborado, devem também ser realizados ensaios a duas ou três temperaturas diferentes: Birch (13)(14) descreve um método desse tipo, que se resume no apêndice 6. Contudo, os conhecimentos atuais são insuficientes para decidir quais os modelos cinéticos aplicáveis à biodegradação de produtos químicos no tratamento de águas residuais e no meio aquático em geral. A aplicação da cinética de Monod, que se refere no apêndice 6 a título de exemplo, limita-se a produtos químicos presentes em quantidades não inferiores 1 mg/l, embora, de acordo com algumas fontes, isto tenha ainda de ser demonstrado. O apêndice 7 diz respeito a ensaios a concentrações mais próximas das observadas nas águas residuais; contudo, esses ensaios, assim como os que constam do apêndice 6, não constituem, por si só, métodos diferenciados.

Filtros

6. Tem sido dada uma menor atenção aos modelos com filtros de percolação, provavelmente por ocuparem mais espaço e serem menos compactos do que os modelos de estações de lamas ativadas. Gerike *et al.* desenvolveram unidades de filtração em leito percolador e utilizaram-nas interligadas (15). Os filtros utilizados são relativamente grandes (altura 2 m; volume 60 l) e cada um deles necessita de um caudal de águas residuais da ordem de 2 l/h. Baumann *et al.* (16) simularam filtros de leito percolador inserindo fitas de poliéster "aveludado" em tubos de 1 m (14 mm de diâmetro interno) previamente imersas durante 30 minutos em lamas ativadas concentradas. O produto químico em estudo, única fonte de carbono numa solução de sais minerais, foi descarregado no tubo vertical e avaliou-se a biodegradação através de medições de COD no efluente e de CO_2 no gás libertado.

7. Foram simulados ainda biofiltros de outra forma (15): as superfícies internas de tubos rotativos, com uma inclinação ligeira em relação à horizontal, foram alimentadas com águas residuais (cerca de 250 ml/h) com e sem o produto químico em estudo, tendo os efluentes recolhidos sido analisados para a determinação do COD e/ou daquele produto.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

8. Este método destina-se a determinar a eliminação e a biodegradação primária e/ou final, por microrganismos aeróbios, de produtos químicos orgânicos hidrossolúveis, num sistema de ensaio em funcionamento contínuo que simula o processo das lamas ativadas. As fontes de carbono e de energia dos microrganismos são um meio orgânico facilmente biodegradável e o produto químico em estudo.

9. Duas unidades de ensaio em funcionamento contínuo (sistema de lamas ativadas ou de vasos porosos) funcionam em paralelo e em condições idênticas, selecionadas de acordo com o objetivo do ensaio. Normalmente, o tempo médio de retenção hidráulica é de 6 h e o tempo de permanência médio (tempo de retenção) das lamas é de 6 a 10 dias. A rejeição das lamas processa-se por um de dois métodos: o produto químico em estudo é geralmente adicionado ao afluente (meio orgânico) de apenas uma das unidades numa concentração compreendida entre 10 mg/l e 20 mg/l de carbono orgânico dissolvido (COD). A segunda unidade é utilizada como unidade de controlo para determinar a biodegradação do meio orgânico.

▼M4

10. Determina-se o COD (de preferência), ou a carência química de oxigénio (CQO), juntamente com a concentração do produto químico em estudo (se necessário), por meio de análises específicas efetuadas a amostras, colhidas com frequência, do efluente da unidade que recebe o produto químico em estudo. Presume-se que a diferença entre as concentrações de COD ou de CQO no efluente das unidades de ensaio e de controlo, é devida ao produto químico em estudo ou aos seus metabolitos orgânicos. Essa diferença é comparada com a concentração de COD ou CQO no afluente ao produto químico em estudo, a fim de determinar a eliminação deste.

11. A biodegradação pode geralmente distinguir-se da bioadsorção através de um exame cuidadoso da curva de eliminação em função do tempo, podendo confirmar-se através de um ensaio de biodegradabilidade "fácil", por recurso a um inóculo aclimatado da unidade recetora do produto químico em estudo.

INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

12. A pureza, a hidrossolubilidade, a volatilidade e as características de adsorção do produto químico em estudo devem ser conhecidas, a fim de permitir uma interpretação correta dos resultados. Em geral, os produtos químicos voláteis e os produtos químicos insolúveis não podem ser alvo de ensaio, salvo se forem tomadas precauções especiais (ver o apêndice 5). A estrutura química ou, pelo menos, a fórmula empírica, devem também ser conhecidas para o cálculo dos valores teóricos e/ou a confirmação dos valores medidos de parâmetros como, por exemplo, a carência teórica de oxigénio (CTeO), o carbono orgânico dissolvido (COD) e a carência química de oxigénio (CQO).

13. O facto de se dispor de informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo para os microrganismos (apêndice 4) pode ser útil para selecionar concentrações de ensaio adequadas e essencial para uma interpretação correta dos valores baixos de biodegradação que possam surgir.

NÍVEIS DE APROVAÇÃO

14. Na aplicação inicial do presente ensaio de simulação (confirmação) da biodegradação primária de tensioativos, era necessário que mais de 80 % do produto químico em causa fosse removido antes de o tensioativo poder ser comercializado. Se a referida percentagem não for atingida, pode recorrer-se ao presente ensaio de simulação (confirmação) e o tensioativo só pode ser comercializado se mais de 90 % do produto químico causa for removido. Com a maioria dos produtos químicos, não se coloca a questão da aprovação ou não aprovação e a percentagem de remoção obtida pode ser utilizada no cálculo aproximado da concentração ambiental provável a utilizar na avaliação dos perigos associados aos produtos químicos. Os resultados tendem a seguir um padrão "tudo ou nada". Numa série de estudos de produtos químicos puros, observou-se uma percentagem de remoção de COD superior a 90 % em mais de três quartos dos produtos químicos que revelaram um grau significativo de biodegradabilidade e superior a 80 % em mais de 90 % deles.

15. Às concentrações utilizadas no presente ensaio (cerca de 10 mg C/l), relativamente poucos produtos químicos (por exemplo, tensioativos) estão presentes nas águas residuais. Alguns produtos químicos podem ter efeitos inibidores a estas concentrações, ao passo que a cinética da remoção de outros pode apresentar diferenças a baixas concentrações. É possível efetuar uma avaliação mais precisa da degradação por recurso a métodos modificados, utilizando concentrações baixas realistas do produto químico em estudo; os dados obtidos podem ser utilizados para o cálculo das constantes cinéticas. No entanto, as técnicas experimentais necessárias ainda não foram totalmente validadas, nem foram estabelecidos os modelos cinéticos que descrevem as reações de biodegradação (ver o apêndice 7).

▼M4

SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

16. A fim de garantir uma execução correta do processo experimental, pode ser útil submeter a ensaio substâncias de comportamento conhecido, juntamente com os produtos químicos em estudo. Entre as primeiras contam-se o ácido adípico, o 2-fenilfenol, o 1-naftol, o ácido difénico, o ácido 1-naftóico, etc. (9)(10)(11).

REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS

17. Há muito menos referências de ensaios de simulação que de ensaios de determinação da biodegradabilidade "fácil". No caso dos produtos químicos com degradabilidade igual ou superior a 80 %, a reprodutibilidade entre ensaios simultâneos é boa (desvios de 10 a 15 %), embora a variabilidade aumente se o produto químico for menos degradável. Além disso, nas nove semanas em que decorreram os ensaios, alguns produtos químicos próximos do limite produziram resultados muito díspares (por exemplo, 10 % e 90 %) em diversas ocasiões.

18. Observou-se poucas diferenças nos resultados obtidos com os dois tipos de dispositivos, mas alguns produtos químicos exibiram uma degradação mais completa e constante na presença de águas residuais domésticas do que com o efluente sintético previsto no método da OCDE.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Dispositivos

Sistema de ensaio

19. O sistema de ensaio de um produto químico é constituído por uma unidade de ensaio e uma unidade de controlo; contudo, quando apenas se efetuam análises específicas (biodegradação primária), só é necessária uma unidade de ensaio. Pode ser utilizada uma unidade de controlo para várias unidades de ensaio que utilizem o mesmo produto químico em estudo ou produtos químicos diferentes. Em caso de interligação de unidades de ensaio (apêndice 3), cada unidade deve ter a sua própria unidade de controlo. O sistema de ensaio pode consistir num modelo de estação de lamas ativadas — unidade de Husmann (apêndice 1, figura 1) ou vaso poroso (apêndice 1, figura 2). Em ambos os casos, são necessários recipientes de armazenagem de dimensões adequadas aos afluentes e efluentes, bem como bombas para a adição do afluente, com ou sem uma solução do produto químico em estudo.

20. Cada unidade da instalação de lamas ativadas é constituída por um tanque de arejamento com uma determinada capacidade (cerca de três litros de lamas ativadas) e um separador (clarificador secundário) com capacidade de cerca de 1,5 litros; até certo ponto, os volumes podem ser alterados, mediante o ajustamento da altura do separador. São admissíveis recipientes de dimensões diferentes, desde que processam cargas hidráulicas comparáveis. Se não for possível manter a temperatura do local de ensaio no intervalo desejado, recomenda-se a utilização de recipientes com circulação de água a temperatura regulada. Utiliza-se uma bomba de ar ou uma bomba de dosagem para transferir as lamas ativadas do separador para o recipiente de arejamento, de forma contínua ou intermitente, a intervalos regulares.

21. O sistema de vasos porosos é composto por um cilindro poroso interno com fundo cónico, montado num recipiente ligeiramente maior de plástico impermeável, com a mesma forma. Um material adequado para o recipiente é polietileno poroso com poros de 90 µm de diâmetro máximo e 2 mm de espessura. A separação das lamas do meio orgânico tratado é efetuada por passagem diferencial através da parede porosa. Os efluentes são recolhidos no espaço anular, do qual transitam para o recipiente de recolha. Dado não ocorrer precipitação, não se regista retorno de lamas. O sistema, no seu conjunto, pode ser montado num banho-maria com controlo termostático. Os vasos porosos obstruem-se e podem transbordar nas fases iniciais. Nesse

▼M4

caso, substituir o revestimento poroso por um revestimento novo, extraindo, por bombagem, as lamas do recipiente para um balde limpo e removendo o revestimento. Após a limpeza do cilindro impermeável exterior, inserir um novo revestimento e retransferir as lamas no recipiente. As lamas aderentes às faces obstruídas do revestimento são também removidas cuidadosamente e transferidas. Começar por limpar os recipientes obstruídos, por meio de um jato fino de água, de forma a remover a lama remascente; enxaguar com uma solução diluída de hipoclorito de sódio e, seguidamente, com água, antes de proceder a uma lavagem completa com água.

22. Para o arejamento das lamas nos tanques de arejamento de ambos os sistemas podem utilizar-se métodos adequados, como, por exemplo, cubos sinterizados (rochas difusoras) e ar comprimido. Se necessário, o ar deve ser depurado, por passagem por um filtro adequado ou por lavagem. Deve circular pelo sistema uma quantidade de ar suficiente para manter as condições aeróbias e manter os flocos das lamas em suspensão permanente, durante o ensaio.

Dispositivo de filtração ou centrifugação

23. Dispositivo de filtração das amostras com filtros de membrana de porosidade adequada (diâmetro nominal da abertura: 0,45 μm), que adsorva substâncias orgânicas solúveis e liberte uma quantidade mínima de carbono orgânico. Caso se utilizem filtros que libertem carbono orgânico, lavá-los cuidadosamente com água quente, para eliminar o carbono orgânico lixiviável. Em alternativa, pode utilizar-se uma centrifugadora que produza 40 000 m/s^2.

Equipamento de análise

24. Aparelhos que permitam determinar os seguintes parâmetros:

— COD (carbono orgânico dissolvido) e COT (carbono orgânico total), ou CQO (carência química de oxigénio),

— substância específica, se necessário,

— sólidos em suspensão, pH, concentração de oxigénio na água,

— temperatura, acidez e alcalinidade,

— amónio, nitritos e nitratos, se o ensaio for executado em condições de nitrificação.

Água

25. Água da rede de abastecimento, com menos de 3 mg/l de COD. Determinar a alcalinidade, se não for conhecida.

26. Água desionizada, com menos de 2 mg/l de COD.

Meio orgânico

27. Podem utilizar-se como meio orgânico águas residuais sintéticas, águas residuais domésticas ou uma combinação de ambas. Foi demonstrado (11) (14) que a utilização de águas residuais domésticas simples origina com frequência uma maior percentagem de remoção de COD, permitindo mesmo a remoção e biodegradação de alguns produtos químicos que não sofrem biodegradação quando se utiliza o efluente sintético OCDE. Além disso, a adição permanente ou intermitente de águas residuais domésticas estabiliza frequentemente as lamas ativadas, melhorando a capacidade de precipitação, que constitui um parâmetro essencial. Recomenda-se, pois, a utilização de águas residuais domésticas. Determinar a concentração de COD (ou a CQO) de cada novo lote de meio orgânico. Deve conhecer-se a acidez ou a alcalinidade do meio orgânico. Se esta acidez ou alcalinidade for baixa, pode ser necessário adicionar ao meio um tampão adequado (hidrogenocarbonato de sódio ou di-hidrogenofosfato de potássio), para manter o pH no tanque de arejamento a cerca de 7,5 ± 0,5, durante o ensaio. A quantidade de solução-tampão e o momento em que é adicionada devem ser decididos caso a caso. Quando as misturas são utilizadas de forma contínua ou intermitente, o seu teor de COD, ou a CQO, devem ser mantidos a um valor aproximadamente constante, por exemplo, diluindo com água.

▼M4

Águas residuais sintéticas

28. Dissolver, por cada litro de água da rede de abastecimento, 160 mg de peptona; 110 mg de extrato de carne; 30 mg de ureia; 28 mg de hidrogenofosfato dipotássico anidro (K_2HPO_4); 7 mg de cloreto de sódio (NaCl); 4 mg de cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2.2H_2O$); 2 mg de sulfato de magnésio hepta-hidratado ($Mg_2SO_4.7H_2O$). O efluente sintético OCDE constitui um exemplo e proporciona uma concentração média de COD no afluente de cerca de 100 mg/l. Em alternativa, podem utilizar-se composições mais próximas das das águas residuais em estudo, com uma concentração idêntica de COD. Se for necessário um afluente menos concentrado, diluir o efluente sintético, por exemplo, na proporção 1:1, com água da rede de abastecimento, de forma a obter uma concentração da ordem de 50 mg/l. O recurso a uma concentração mais baixa permitirá uma melhor proliferação dos organismos nitrificantes, pelo que esta modificação é aconselhável caso o estudo diga respeito à simulação de estações de tratamento de águas residuais com nitrificação. O efluente sintético, numa forma concentrada, pode ter por base água destilada e ser armazenado a cerca de 1 °C durante uma semana, no máximo. Se necessário, diluir com água da rede de abastecimento (este meio não é inteiramente satisfatório, uma vez que, por exemplo, a concentração de azoto é muito elevada e o teor de carbono relativamente baixo, mas não foram sugeridas alternativas melhores, exceto a adição de mais fosfato no tampão e de uma quantidade suplementar de peptona).

Águas residuais domésticas

29. Utilizar águas residuais recentemente decantadas, recolhidas diariamente numa instalação de tratamento que processe predominantemente esgotos domésticos. A amostra deve ser recolhida, antes de decantação primária, da conduta de alimentação do decantador, ou da conduta de alimentação da instalação de lamas ativadas, e ter a menor quantidade possível de partículas grosseiras. As águas residuais podem ser utilizadas após terem sido armazenadas durante vários dias (em geral, não mais de sete), a cerca de 4 °C, caso se apresentem provas de que o COD (ou a CQO) não baixou significativamente (ou seja, mais de 20 %) durante a armazenagem. A fim de evitar perturbações do sistema, o COD (ou a CQO) de cada novo lote deve ser ajustado, antes da utilização, para um valor constante, por exemplo, através de diluição com água da rede de abastecimento.

Lamas ativadas

30. As lamas ativadas para inoculação devem ser recolhidas num tanque de arejamento de uma estação de tratamento de águas residuais explorada corretamente ou numa unidade de lamas ativadas à escala laboratorial, que trate predominantemente águas residuais domésticas.

Soluções-mãe da substância em estudo

31. No caso de produtos químicos com solubilidade adequada, preparar soluções-mãe de reserva de concentrações apropriadas (por exemplo, 1 a 5 g/l) em água desionizada, ou na fração mineral do efluente sintético (no caso de produtos químicos insolúveis e voláteis, ver o apêndice 5). Determinar o COD e o carbono orgânico total (COT) da solução-mãe e repetir as medições para cada novo lote. Se a diferença entre o COD e o COT for superior a 20 %, verificar a solubilidade em água do produto químico em estudo. Comparar o COD ou a concentração do produto químico em estudo determinados por análise específica da solução-mãe com o valor nominal, de forma a averiguar se a recuperação é suficiente (em geral, deve ser superior a 90 %). Verificar, em especial no caso das dispersões, se o COD pode ou não ser utilizado como parâmetro analítico, ou se é necessário utilizar uma técnica analítica específica para o produto químico em causa. Com as dispersões, é necessário proceder à centrifugação das amostras. Para cada novo lote, determinar o COD, a CQO ou o produto químico em estudo por meio de uma análise específica.

▼M4

32. Determinar o pH da solução-mãe. A ocorrência de valores extremos indica que a adição do produto químico pode influenciar o pH das lamas ativadas no sistema de ensaio. Neste caso, neutralizar a solução de reserva com pequenas quantidades de ácido ou de base, de forma a obter um pH de 7,0 ± 0,5, evitando, contudo, a precipitação do produto químico em estudo.

PROCEDIMENTO

33. O procedimento descrito é aplicável a unidades de instalações de lamas ativadas; no caso de um sistema de vasos porosos, tem de sofrer adaptações ligeiras.

Preparação do inóculo

34. No início do ensaio, inocular o sistema com lamas ativadas ou com um inóculo com baixa concentração de microrganismos. Manter o inóculo arejado à temperatura ambiente, até ser utilizado (em menos de 24 horas). No primeiro caso, colher uma amostra de lama ativada do tanque de arejamento de uma estação de tratamento de águas residuais biológica que funcione de forma eficiente, ou de uma estação de tratamento à escala laboratorial, que processe essencialmente efluentes domésticos. Se for necessário simular condições de nitrificação, utilizar lamas provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais com nitrificação. Determinar a concentração de sólidos em suspensão e, se necessário, concentrar as lamas por sedimentação, de forma a que o volume adicionado ao sistema de ensaio seja mínimo. Assegurar uma concentração inicial de matéria seca da ordem de 2,5 g/l.

35. No segundo caso, utilizar como inóculo 2 a 10 ml/l de efluente proveniente de uma estação de tratamento de águas residuais domésticas biológica. Para dispor do maior número possível de diferentes espécies de bactérias, pode ser útil adicionar inóculos provenientes de várias fontes, como, por exemplo, águas de superfície. Neste caso, as lamas ativadas desenvolver-se-ão e proliferarão no sistema de ensaio.

Introdução de meio orgânico

36. Assegurar que os recipientes do afluente e do efluente, bem como a conduta entre o primeiro e o segundo, são bem limpos, de forma a eliminar qualquer proliferação de flora microbiana antes do ensaio e durante o mesmo. Montar os sistemas de ensaio num compartimento com controlo de temperatura (em geral, na gama 20-25 °C) ou utilizar unidades com circulação de água. Preparar um volume suficiente de meio orgânico (pontos 27 e 29). Começar por encher o tanque de arejamento e o separador com o meio orgânico, adicionando em seguida o inóculo (pontos 34, 35). Iniciar o arejamento de modo a manter as lamas em suspensão, em condições aeróbias, e começar a introdução do afluente e a reciclagem das lamas decantadas. Transferir o meio orgânico dos tanques de armazenagem para os recipientes de arejamento (pontos 20 e 21) das unidades de ensaio e de controlo, e recolher os respetivos efluentes em tanques de armazenagem idênticos. Para obter o tempo de retenção hidráulica normal (6 h), o meio orgânico é bombeado a 0,5 l/h. Para confirmar este caudal, medir a quantidade diária de meio orgânico adicionado, registando o decréscimo dos volumes do meio nos recipientes de armazenagem. Para determinar os efeitos das descargas intermitentes e descargas intensivas de produtos químicos, seriam necessárias outras formas de dosagem.

37. Se o meio orgânico for preparado para utilização por um período superior a um dia, é necessário arrefecê-lo a cerca de 4 °C, ou recorrer a outros métodos adequados de conservação, para evitar a proliferação de microrganismos e a ocorrência de biodegradação fora das unidades de ensaio (ponto 29). Se for utilizado efluente sintético, pode preparar-se, e armazenar-se a cerca de 4 °C, uma solução-mãe concentrada (por exemplo, com uma concentração 10 vezes superior à normal - ponto 28). Esta solução pode ser diluída com um volume adequado de água da rede de abastecimento, antes da utilização. Em alternativa, pode ser bombeada diretamente, sendo o referido volume adequado de água da rede de abastecimento bombeado separadamente.

▼M4

Introdução do produto químico em estudo

38. Adicionar um volume adequado da solução-mãe do produto químico em estudo (ponto 31) ao recipiente de armazenagem de efluente ou introduzi-la diretamente, com uma bomba, no tanque de arejamento. A concentração média normal do produto químico em estudo no afluente deve estar compreendida entre 10 mg/l e 20 mg/l de COD, não devendo exceder 50 mg/l. Se a solubilidade em água do produto químico for baixa, ou se for provável a ocorrência de efeitos tóxicos, reduzir a concentração para 5 mg/l de COD ou menos, mas apenas se estiver disponível e puder ser aplicado um método analítico específico (os produtos químicos dispersos que forem pouco solúveis em água podem ser adicionadas por recurso a técnicas especiais de dosagem — ver o apêndice 5).

39. Começar a adcionar o produto químico em estudo após um período necessário à estabilização do sistema e à eliminação eficiente (cerca de 80 %) do COD do meio orgânico. Antes da adição do produto químico, é importante verificar se todas as unidades estão a funcionar de forma igualmente eficaz; se tal não for o caso, justifica-se, geralmente, misturar as lamas e redistribuir volumes iguais pelas unidades. Quando se utiliza um inóculo de cerca de 2,5 g/l (massa a seco) de lama ativada, o produto químico em estudo pode ser adicionado no início do ensaio, uma vez que a adição direta de quantidades crescentes desde o início apresenta a vantagem de as lamas ativadas poderem adaptar-se melhor à substância. Independentemente do método de adição, recomenda-se que o caudal e/ou os volumes no(s) recipiente(s) de armazenagem sejam medidos com intervalos regulares.

Processamento das lamas ativadas

40. Durante o ensaio, independentemente do inóculo utilizado, a concentração das lamas ativadas sólidas estabiliza-se, em geral, entre determinados limites, no intervalo de 1 a 3 g/l (massa a seco), em função da natureza e da concentração do meio orgânico, das condições de funcionamento, da natureza dos microrganismos presentes e da influência do produto químico em estudo.

41. Determinar os sólidos em suspensão nos tanques de arejamento, pelo menos, uma vez por semana e eliminar o excesso de lamas, de forma a manter a concentração na gama 1 g/l a 3 g/l (massa a seco), ou manter constante o tempo de permanência médio das lamas (em geral, na gama de 6 a 10 dias). Se, por exemplo, for escolhido um tempo de retenção das lamas de oito dias, remover diariamente e eliminar 1/8 do volume das lamas ativadas contidas no tanque de arejamento. Efetuar esta operação diariamente ou, de preferência, recorrer a um dispositivo automático de bombagem intermitente. O facto de manter a concentração de sólidos em suspensão a níveis constantes, ou dentro de limites restritos, não permite obter um valor constante do tempo de retenção das lamas, parâmetro que condiciona a concentração do produto químico em estudo no efluente.

42. Durante todo o ensaio, remover, pelo menos uma vez por dia, as lamas aderentes às paredes do tanque de arejamento e do separador, de forma a repô-las em suspensão. Verificar e limpar regularmente todas as tubagens, para impedir a formação de biofilmes. Transferir a lama decantada do separador para o tanque de arejamento, de preferência por bombagem intermitente. Embora não ocorra reciclagem no sistema de vasos porosos, importa assegurar que são inseridos vasos interiores limpos antes de o volume no tanque aumentar significativamente (ponto 21).

43. Nas unidades de Husmann, pode observar-se precipitação deficiente e perda de lamas. Estas ocorrências podem ser retificadas através de um dos procedimentos que se referem de seguida, aplicados em paralelo nas unidades de ensaio e de controlo:

— podem adicionar-se a intervalos regulares (por exemplo, semanalmente) lamas frescas ou floculante (por exemplo, 2 ml de solução de 50 g/l $FeCl_3$ por tanque), verificando, porém, que não ocorre qualquer reação nem precipitação do produto químico em estudo com $FeCl_3$,

▼M4

— a bomba de ar pode ser substituída por uma bomba peristáltica que proprocione um caudal de recirculação das lamas aproximadamente igual ao caudal do afluente e o desenvolvimento de uma zona anaeróbia nas lamas decantadas (a geometria da bomba de ar limita o caudal mínimo das lamas de retorno a cerca de doze vezes o caudal do afluente),

— as lamas podem ser bombeadas por intermitência do separador do tanque de arejamento (por exemplo, 5 minutos em cada 2,5 h, para reciclar de 1 a 1,5 l/h),

— pode utilizar-se um agente antiespumante não tóxico (por exemplo, óleo de silicone), numa concentração mínima, para evitar as perdas através das espumas,

— pode-se fazer borbulhar ar nas lamas do separador, em rajadas curtas (por exemplo, 10 segundos por hora),

— o meio orgânico pode ser introduzido no tanque de arejamento a intervalos regulares (por exemplo, 3 a 10 minutos por hora).

Amostragem e análise

44. Medir, a intervalos regulares, a concentração de oxigénio dissolvido, a temperatura e o pH das lamas ativadas, nos tanques de arejamento. Garantir que esteja sempre presente oxigénio em quantidade suficiente (> 2 mg/l) e a temperatura seja mantida na gama pretendida (em geral, de 20 ºC a 25 ºC). Manter o pH a 7,5 ± 0,5, por adição de pequenas quantidades de base ou ácido inorgânicos no tanque de arejamento ou no afluente, ou aumentando a capacidade-tampão do meio orgânico (ver ponto 27). A nitrificação produz ácido; a oxidação de 1 mg de azoto produz o equivalente de cerca de 7 mg de CO_3^{2-}. A frequência das medições depende do parâmetro a medir e da estabilidade do sistema, podendo variar consoante as medições sejam diárias ou semanais.

45. Medir o COD ou a CQO nos afluentes dos tanques de ensaio e de controlo. Medir a concentração do produto químico em estudo no afluente respetivo, através de uma análise específica ou por estimativa, com base na sua concentração na solução-mãe (ponto 31), no volume utilizado e na quantidade de águas residuais tratadas na unidade de ensaio. Recomenda-se o cálculo da concentração do produto químico em estudo, a fim de reduzir a variabilidade dos valores obtidos para a concentração.

46. Recolher amostras adequadas nos efluentes (por exemplo, amostras compósitas em 24 h), e filtrar com uma membrana de porosidade 0,45 μm, ou centrifugar a cerca de 40 000 m/s^2 durante 15 minutos. Deve recorrer-se à centrifugação se a filtragem for difícil. Determinar o COD ou a CQO pelo menos em duplicado, para avaliar a biodegradação final e, se necessário, a biodegradação primária, através de uma análise específica do produto químico em estudo.

47. A baixas concentrações, a utilização da CQO pode originar problemas analíticos, pelo que se recomenda apenas para concentrações suficientemente elevadas do produto químico em estudo (cerca de 30 mg/l). Além disso, no caso de produtos químicos fortemente adsorventes, recomenda-se a determinação da quantidade de produto químico em estudo adsorvida nas lamas, por recurso a uma técnica analítica específica.

48. A frequência de amostragem depende da duração prevista do ensaio. Recomenda-se uma frequência de três vezes por semana. Se as unidades estiverem a funcionar eficazmente, prever um período de adaptação de uma semana a, no máximo, seis semanas após a adição do produto químico em estudo, para que seja atingido um estado estacionário. Para a avaliação do resultado do ensaio, obter, de preferência, um mínimo de 15 valores válidos na fase de patamar (ponto 59), que dura, em geral, três semanas. O ensaio pode ser concluído se for observado um grau de eliminação suficiente (por exemplo, superior a 90 %) e se estiverem disponíveis os 15 valores referidos, representativos de análises efetuadas todos os dias durante três semanas. A duração do ensaio não deve, em geral, exceder 12 semanas após a adição do produto químico em estudo.

▼M4

49. Se as lamas nitrificarem e se pretender estudar os efeitos do produto químico em estudo na nitrificação, determinar o amónio e/ou os nitritos, bem como os nitratos, em amostras dos efluentes das unidades de ensaio e de controlo, pelo menos uma vez por semana.

50. Todas as análises (em especial as determinações de azoto) devem ser efetuadas tão rapidamente quanto possível. Se for necessário adiar a realização das análises, armazenar as amostras a cerca de 4 °C, na obscuridade, em garrafas hermeticamente fechadas. Se for necessário armazenar as amostras por um período superior a 48 horas, conservá-las por ultracongelação, acidificação (por exemplo, com 10 ml/l de solução de ácido sulfúrico a 400 g/l) ou por adição de uma substância tóxica adequada (por exemplo, 20 ml/l de uma solução de cloreto de mercúrio (II) a 10 g/l). Assegurar que a técnica de conservação não influencia os resultados da análise.

Interligação das unidades de ensaio

51. Caso se recorra a uma interligação (apêndice 3), efetuar diariamente trocas da mesma quantidade de lamas ativadas (150 ml a 1 500 ml, no caso de tanques de arejamento que contenham 3 litros de fase líquida) entre os tanques de arejamento da unidade de ensaio e da unidade de controlo. Se o produto químico em estudo for fortemente adsorvido pelas lamas, alterar apenas o sobrenadante dos separadores. Em ambos os casos, utilizar um fator de correção para calcular os resultados dos ensaios (ponto 55).

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

52. Calcular a percentagem de eliminação do produto químico em estudo, em termos de COD ou de CQO, para cada avaliação programada, por recurso à equação:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

em que

D_t = % de eliminação do COD ou da CQO no instante *t*

C_s = COD ou CQO no afluente devidos ao produto químico em estudo, estimado, de preferência, a partir da solução-mãe (mg/l)

E = valor medido de COD ou CQO no efluente em estudo, no instante *t* (mg/l)

E_o = valor medido de COD ou CQO no efluente de controlo, no instante *t* (mg/l)

53. O grau de eliminação de COD ou de CQO do meio orgânico da unidade de controlo é uma informação útil para avaliar a atividade de biodegradação das lamas ativadas, durante o ensaio. Calcular a percentagem de eliminação por recurso à equação:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

em que

D_B = % de eliminação do COD ou da CQO do meio orgânico na unidade de controlo, no instante *t*

C_M = COD ou de CQO do meio orgânico no afluente de controlo (mg/l)

▼M4

Como opção, calcular a percentagem de eliminação do COD ou da CQO devida ao meio orgânico e ao produto químico em estudo na unidade de ensaio, com base na seguinte equação:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

em que

D_T = % de eliminação do COD ou da CQO total do afluente em estudo

C_T = COD ou CQO total do afluente em estudo, ou calculados a partir das soluções-mãe (mg/l)

54. Calcular a remoção do produto químico em estudo, se determinada por um método analítico específico, em cada instante, com base na equação:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

em que

D_{ST} = % de eliminação primária do produto químico em estudo, no instante *t*

S_i = concentração medida ou estimada do produto químico em estudo no afluente (mg/l)

S_e = concentração medida ou estimada do produto químico em estudo no efluente, no instante *t* (mg/l)

55. Caso tenha sido utilizado o modo de interligação, compensar, através de um fator de correção, a diluição do produto químico em estudo no tanque de arejamento devida à substituição das lamas (ver o apêndice 3). Se tiver sido utilizado um tempo de retenção hidráulica médio de 6 h e se tiver procedido à substituição de metade do volume de lamas ativadas contido no tanque de arejamento, é necessário corrigir os valores de eliminação diária determinados (D_t, ponto 52), de forma a obter o verdadeiro grau de eliminação, D_{tc}, do produto químico em estudo, através da seguinte equação:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Apresentação dos resultados do ensaio

56. Traçar o gráfico da percentagem de remoção, D_t (ou D_{tc}) e D_{st}, consoante o caso, em função do tempo (ver o apêndice 2). A forma da curva de remoção do produto químico em estudo (em relação ao próprio produto ou na forma de COD) permite tirar algumas conclusões sobre o processo de remoção.

Adsorção

57. Caso se observe uma elevada remoção de COD do produto químico em estudo desde o início do ensaio, o produto em causa é, provavelmente, removido por adsorção nos sólidos das lamas ativadas. É possível comprovar este fenómeno através da determinação da quantidade de produto químico em estudo adsorvido, por recurso a um método de análise específico. Não é habitual que a eliminação do COD de produtos químicos adsorvíveis se mantenha a um nível elevado durante todo o ensaio; em geral, observa-se um elevado grau de eliminação no início, que baixa progressivamente para um valor de equilíbrio. Contudo, se o produto químico adsorvível em estudo tiver causado, de qualquer forma, a aclimatação da flora microbiana, a remoção do seu COD poderá aumentar posteriormente, estabilizando-se em valores elevados.

▼M4

Fase de latência

58. Muitos produtos químicos em estudo passam por uma fase de latência, antes de ocorrer a biodegradação completa, nomeadamente nos ensaios estáticos de rastreio. Na fase de latência, ocorre a aclimatação ou adaptação das bactérias responsáveis pela degradação, não se observando praticamente qualquer eliminação do produto químico em estudo; a proliferação das bactérias inicia-se em seguida. Esta fase termina, iniciando-se a fase de degradação, quando for eliminada cerca de 10 % da quantidade inicial de produto químico em estudo (após a adsorção, caso ocorra). Em geral, a fase de latência é muito variável e pouco reprodutível.

Fase de patamar

59. A fase de patamar da curva de eliminação de um ensaio contínuo é definida como a fase em que ocorre a degradação máxima. Deve durar, pelo menos, três semanas, durante as quais importa determinar cerca de 15 valores válidos.

Grau de eliminação médio do produto químico em estudo

60. Calcular o valor médio a partir dos valores de eliminação (D_t) obtidos para o produto químico em estudo na fase de patamar. O grau de eliminação do produto químico em estudo é arredondado ao número inteiro mais próximo (1 %). Recomenda-se também o cálculo do intervalo de confiança de 95 % do valor médio.

Eliminação do meio orgânico

61. Desenhar o gráfico da percentagem de eliminação do COD ou da CQO do meio orgânico na unidade de controlo (D_B) em função do tempo. Indicar o grau de eliminação médio da mesma forma que para o produto químico em estudo (ponto 60).

Indicação da biodegradação

62. Se o produto químico em estudo não for adsorvido de forma significativa pelas lamas ativadas e a curva de eliminação tiver a forma característica de uma curva de biodegradação com fases de latência, degradação e patamar (pontos 58 e 59), a remoção determinada pode ser atribuída com confiança à biodegradação. Se ocorrer uma elevada remoção inicial, o ensaio de simulação não permite distinguir os processos de eliminação biológicos dos abióticos. Nesses casos, e noutros em que existam dúvidas quanto a biodegradação (por exemplo, se ocorrer separação), analisar o produto químico em estudo adsorvido ou efetuar mais ensaios estáticos de biodegradação com base em parâmetros que comprovem claramente os processos biológicos. Trata-se, designadamente, dos métodos baseados no consumo de oxigénio [capítulo C.4, D, E e F do presente anexo (6)], de um ensaio com medição do dióxido de carbono produzido [capítulo C.4 C do presente anexo (6)] ou do método de *headspace* da ISO (18), utilizando um inóculo pré-exposto do ensaio de simulação. Se tiverem sido determinadas a remoção do COD e a eliminação das substâncias específicas, a ocorrência de diferenças significativas entre as percentagens (primeiro valor superior ao segundo) indicam a presença nos efluentes de substâncias orgânicas intermediárias cuja degradação pode ser mais difícil que a da substância de origem.

Validade dos resultados

63. Obtêm-se informações sobre o comportamento do inóculo em matéria de biodegradação se for determinado o grau de eliminação do meio orgânico (ponto 53) da unidade de controlo. Considerar o ensaio válido se, decorridas duas semanas, o grau de eliminação do COD ou da CQO da(s) unidade(s) de controlo exceder 80 % e não se registarem quaisquer ocorrências relevantes.

▼M4

64. Se tiver sido utilizada uma substância de referência facilmente biodegradável, o grau de biodegradação (D_T, ponto 52) deve ser superior a 90 %.

65. Se o ensaio for efetuado em condições de nitrificação, a concentração média nos efluentes devem ser inferior a 1 mg/l de azoto amoniacal e a 2 mg/l de azoto na forma de nitritos.

66. Se esses critérios (pontos 63-65) não forem cumpridos, repetir o ensaio utilizando um inóculo de origem diferente, submeter a ensaio uma substância de referência e rever todos os procedimentos experimentais.

Relatório do ensaio

67. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produto químico em estudo:

— dados de identificação,

— natureza física e, quando pertinente, propriedades físico-químicas.

Condições de ensaio:

— tipo de sistema de ensaio; quaisquer alterações introduzidas para o ensaio de produtos químicos insolúveis e voláteis,

— tipo de meio orgânico,

— proporção e natureza das águas residuais provenientes de indústrias, se conhecidas,

— inóculo: natureza e local(is) de amostragem, concentração e eventual pré-tratamento,

— solução-mãe do produto químico em estudo: teor de COD e COT; forma de preparação, caso se trate de uma suspensão; concentração de ensaio utilizada; fundamentação de um eventual afastamento da gama de 10 a 20 mg/l de COD; método de adição; data da primeira adição; quaisquer alterações,

— tempo de permanência médio das lamas e tempo médio de retenção hidráulica; método de remoção das lamas; métodos para evitar a mistura e a perda de lamas, etc.,

— técnicas de análise utilizadas,

— temperatura de ensaio,

— qualidades das lamas misturadas, índice de volume das lamas, mistura de sólidos em suspensão no meio fluido,

— eventuais desvios aos procedimentos normalizados e quaisquer ocorrências que possam ter afetado os resultados.

Resultados do ensaio:

— todos os valores medidos (COD, CQO, análises específicas, pH, temperatura, concentração de oxigénio, sólidos em suspensão, substâncias azotadas, se for caso disso,

— todos os valores calculados dos parâmetros D_t (ou D_{tc}), D_B, D_{St}, na forma de quadro e a partir das curvas de eliminação,

— informações sobre as fases de latência e de patamar, a duração do ensaio, o grau de eliminação do produto químico em estudo e do meio orgânico na unidade de controlo, juntamente com dados estatísticos e conclusões sobre a biodegradabilidade e a validade do ensaio,

— discussão dos resultados.

▼M4

REFERÊNCIAS:

(1) Swisher RD (1987). "Surfactant Biodegradation", 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

(2) Governo alemão (1962): Verordnung über die Abbaubarkeit von Detergentien in Wasch- un Reinigungsmitteln. *Bundesgesetzblatt*, Pt.1 No.49: 698--706.

(3) Painter H.A., King E.F. (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, Reino Unido.

(4) Painter H.A., King E.F. (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. *Wat. Res*. 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

(6) Capítulo C.4 deste anexo: "Determinação da biodegradabilidade "fácil"".

(7) Capítulo C.12 deste anexo: "Biodegradação - Ensaio L.A.S.C. modificado".

(8) Capítulo C.19 deste anexo: "Estimativa do valor do coeficiente de adsorção (K_{OC}) em solos e em lamas de depuração por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)".

(9) Gerike P., Fischer W.K. (1979): A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. *Ecotox. Env. Saf*. 3:157-173.

(10) Gerike P., Fischer W.K. (1981), como (9), II Additional results and conclusions. *Ecotox. Env. Saf*. 5: 45-55.

(11) Painter H.A., Bealing D, (1989): Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen B.N., Muntau H., Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; revista em 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium - activated sludge simulation test.

(13) Birch R.R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Español. Deterg.: 33-48.

(14) Birch R.R. (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P., Fischer W.K., Holtmann W. (1980): Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. *Wat.Res*. 14: 753-758.

(16) Baumann U., Kuhn G., Benz M. (1998): Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF — *Z. Umweltchem. Ökotox*. 10: 214-220.

(17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. p. 91-98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998). Water Quality — Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

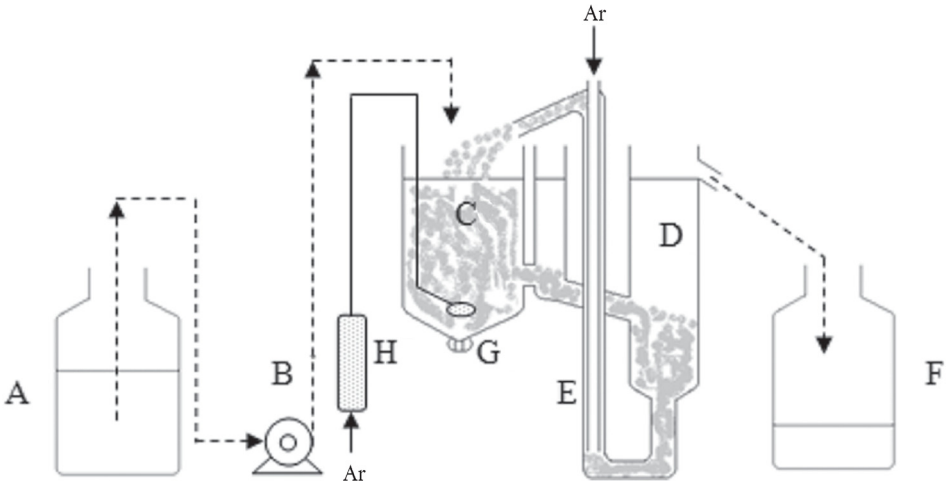
▼M4

Apêndice 1

Figura 1

Equipamentos utilizados para avaliar a biodegradação

Unidade de Husmann

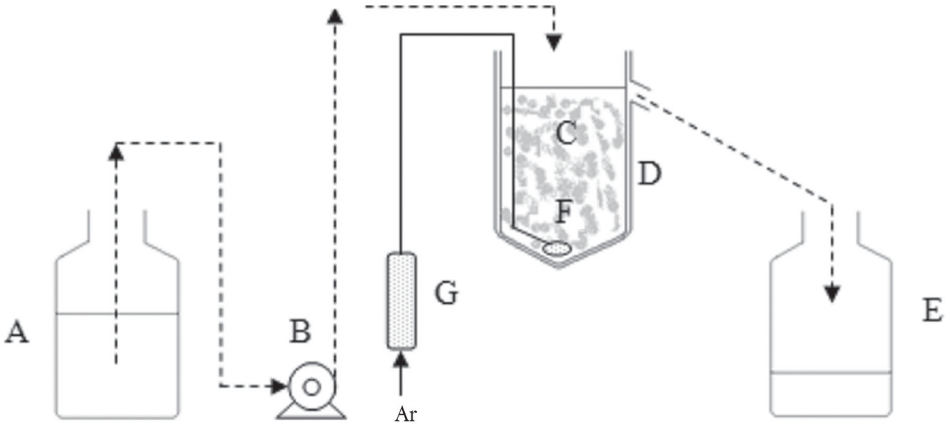


A. Tanque de armazenagem
B. Bomba doseadora
C. Câmara de arejamento (capacidade 3 l)
D. Tanque de decantação
E. Bomba de ar comprimido
F. Tanque de recolha
G. Arejador
H. Medidor do caudal de ar

Figura 2

Equipamentos utilizados para avaliar a biodegradação

Vaso poroso

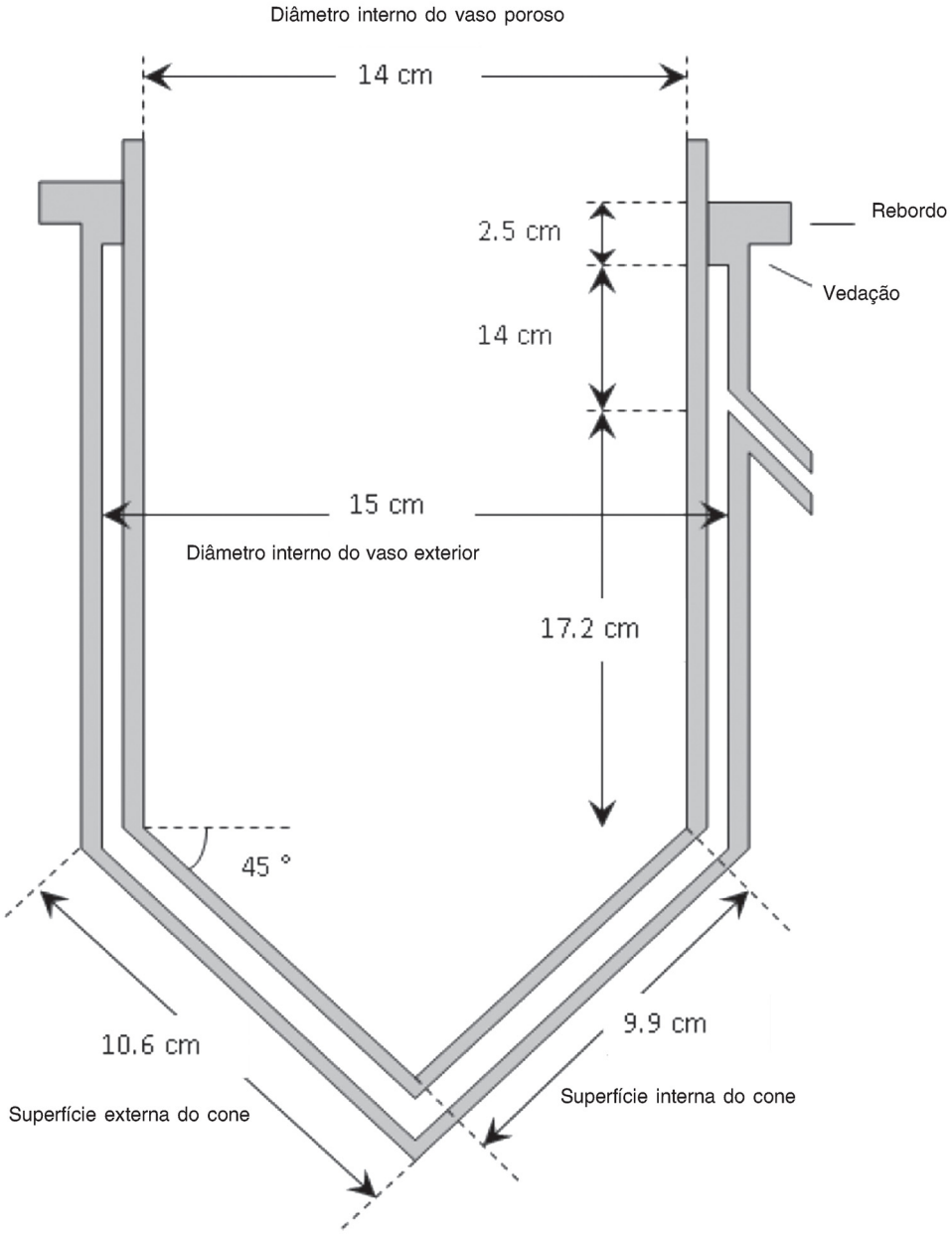


A. Tanque de armazenagem
B. Bomba de dosagem
C. Tanque poroso de arejamento
D. Recipiente exterior impermeável
E. Tanque de recolha
F. Difusor
G. Caudalímetro de ar

▼M4

Figura 3

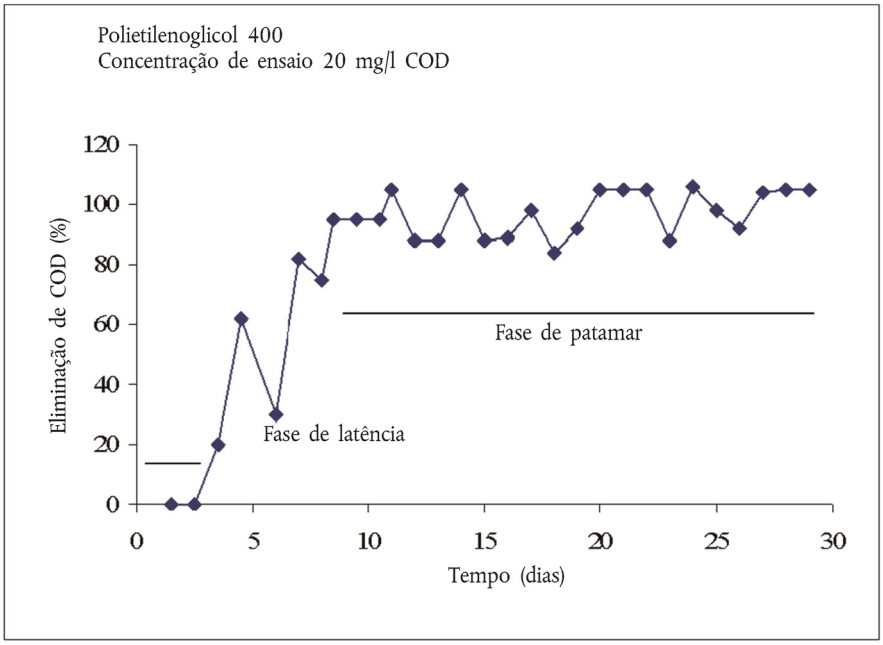
Pormenor do vaso poroso de arejamento de três litros



▼**M4**

Apêndice 2

Exemplo de curva de eliminação



▼M4

Apêndice 3

[INFORMATIVO]

INTERLIGAÇÃO DAS UNIDADES DE ENSAIO

Para tentar igualizar as populações microbianas nas lamas de uma unidade de ensaio que processa águas residuais com um produto químico em estudo e de uma unidade de controlo que apenas processa efluentes, procede-se a uma transferência de lamas diária (1). Este processo designa-se por interligação e o método é conhecido por método das unidades interligadas. A interligação começou por ser efetuada por recurso a unidades de Husmann de lamas ativadas, mas, posteriormente, foram também utilizadas unidades de vasos porosos (2) (3). Não foram registadas diferenças significativas, em termos de resultados, entre unidades interligadas ou não, quer se trate de unidades Husmann ou de vasos porosos, pelo que não se justifica o dispêndio de tempo e energia com a interligação de unidades.

O intercâmbio de lamas pode dar a impressão de ocorrência de uma remoção considerável, uma vez que uma parte do produto químico em estudo nas lamas transferidas e as concentrações do mesmo nos efluentes de ensaio e de controlo são praticamente iguais. É, pois, necessário utilizar fatores de correção, consoante a fração em causa e o tempo médio de retenção hidráulica. A referência (1) contém mais pormenores para o cálculo.

Calcular o valor corrigido do grau de eliminação do COD ou da CQO utilizando a seguinte fórmula geral:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

em que:

D_{tc} = % corrigida de eliminação do COD ou da CQO

D_t = % determinada de eliminação do COD ou da CQO

a = fração trocada do volume das unidades de lamas ativadas

r = tempo médio de retenção hidráulica (h)

Se, por exemplo, metade do volume do recipiente de arejamento for trocada (a = 0,5) e o tempo médio de retenção hidráulica for de 6 h, a fórmula de correção é a seguinte:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

REFERÊNCIAS

(1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975): Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. *Wat. Res*. 9: 1131-1135.

(2) Painter HA, Bealing DJ (1989): Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. p. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(3) Painter HA, King EF (1978): Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, Reino Unido.

▼M4

Apêndice 4

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DAS LAMAS ATIVADAS

Processamento dos produtos químicos em estudo

1. Um produto químico (ou uma água residual) pode não ser degradado ou removido no ensaio de simulação, podendo mesmo apresentar um efeito inibidor nos microrganismos presentes nas lamas. Alguns produtos químicos são biodegradados a baixas concentrações, mas são inibidores a concentrações mais elevadas (hormese). Os efeitos inibidores podem ser detetados numa fase precoce ou podem ser determinados por recurso a um ensaio de toxicidade, utilizando um inóculo semelhante ou idêntico ao utilizado no ensaio de simulação (1). Estes métodos consistem na inibição do consumo de oxigénio (capítulo C.11 do presente anexo (2) e norma ISO 8192, n.º 3) ou na inibição do crescimento dos organismos das lamas (ISO 15522, n.º 4).

2. No ensaio de simulação, observa-se inibição se a diferença de teores de COD ou CQO entre os efluentes do recipiente de ensaio e do recipiente de controlo for superior ao COD correspondente ao produto químico em estudo. Por outras palavras, a percentagem de remoção de COD (ou de CBO, CQO, e/ou NH^{+}_{4}) do meio orgânico tratado baixará devido à presença do produto químico em estudo. Caso tal suceda, o ensaio deve ser repetido, reduzindo-se a concentração do produto químico em estudo até ser atingido um nível em que não ocorra inibição e, eventualmente, até o produto ser biodegradado. Se o produto químico, ou as águas residuais, em estudo revelarem efeitos negativos no processo a todas as concentrações testadas, isso indica que o processamento biológico do produto é difícil, ou mesmo impossível; poderá, contudo, ser interessante repetir o ensaio com lamas ativadas de origem diferente e/ou submetendo as lamas a uma aclimatação mais gradual.

3. Reciprocamente, se o produto químico em estudo for bioeliminado no primeiro ensaio de simulação, a sua concentração deve ser aumentada, caso se pretenda conhecer os seus possíveis efeitos de inibição.

4. Nas tentativas para determinar os graus de inibição, importa recordar que as populações colonizadoras das lamas ativadas podem variar, pelo que, com o tempo, os microrganismos podem exibir tolerância a uma substância inibidora.

5. Cálculo do grau de inibição:

   A percentagem global de remoção (R_o), de CBO, COD, CQO, etc., das unidades de ensaio e de controlo, pode ser calculada com base na equação:

$$R_o = 100\ (I - E)/\ I\%$$

   em que:

   I = concentração de CBO, DOC, COD, etc. no afluente, nos recipientes de ensaio ou de controlo (mg/l)

   E = mesmas concentrações no efluente (mg/l).

   Os valores de I e E devem ser corrigidos para ter em conta o COD atribuível ao produto químico em estudo nas unidades de ensaio, sem o que os cálculos da percentagem de inibição serão incorretos.

▼**M4**

O grau de inibição decorrente da presença do produto químico em estudo é calculado a partir da equação:

$$\% \text{ inibição} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

em que:

R_c = percentagem de remoção nos recipientes de controlo

R_t = percentagem de remoção nos recipientes de ensaio

REFERÊNCIAS

(1) Reynolds L *et al.* (1987): Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. *Chemosphere* 16: 2259.

(2) Captítulo C.11 deste anexo: "Biodegradação — Lamas Ativadas: Ensaios de Inibição da Respiração".

(3) ISO 8192 (2007) Water quality — Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

(4) ISO 15522 (1999) Water Quality — Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Apêndice 5

Produtos químicos em estudo pouco solúveis em água — substâncias voláteis

Produtos químicos pouco solúveis em água

Foram publicados poucos relatórios sobre ensaios de simulação de tratamento de águas residuais com produtos químicos pouco solúveis ou insolúveis em água (1) (2) (3).

Não existe um método único de dispersão da substância em estudo aplicável a todos os produtos químicos insolúveis. Dois dos quatro tipos de métodos descritos na norma ISO 10634 (4) afiguram-se adequados à dispersão dos produtos químicos destinados a ensaios de simulação: trata-se do recurso a agentes emulsionantes e/ou à energia ultrassónica.

Deve determinar-se a estabilidade da dispersão em períodos de, pelo menos, 24 horas.

As dispersões, devidamente estabilizadas, contidas num recipiente com agitação constante (ponto 38), são transferidas para um tanque de arejamento separadamente das águas residuais domésticas ou sintéticas.

Se as dispersões forem estáveis, investigar de que forma o produto químico poderá ser determinado na forma dispersa. É improvável que a determinação do COD seja adequada, devendo, por isso, definir-se para a análise do produto químico um método específico passível de ser aplicado a efluentes, sólidos provenientes de efluentes e lamas ativadas. Pode, então, determinar-se o comportamento do produto no processo de simulação das lamas ativadas, nas fases líquida e sólida. Deve, pois, estabelecer-se um "balanço de massas" para decidir se o produto químico em estudo foi biodegradado. No entanto, esse parâmetro indica apenas a biodegradação primária. Para comprovar a biodegradação final, deve utilizar-se um ensaio respirométrico da biodegradabilidade imediata (capítulo C.4 do presente anexo (5) C, F ou D), utilizando como inóculo lamas expostas ao produto químico em estudo no ensaio de simulação.

Produtos químicos voláteis

A simulação do tratamento das águas residuais com produtos químicos voláteis é discutível e problemática. Tal como no caso dos produtos químicos de baixa solubilidade em água, têm sido publicados muito poucos relatórios sobre ensaios de simulação com produtos químicos voláteis. Um dispositivo de mistura de tipo clássico pode ser adaptado, tapando os tanques de arejamento e de sedimentação, medindo e controlando o fluxo de ar por recurso a fluxómetros e fazendo passar os gases libertados por coletores, para recolha das matérias orgânicas voláteis. Em alguns casos, utiliza-se uma bomba de vácuo para drenar os gases através de um coletor a frio ou de um coletor com purga que contenha Tenax e silica-gel, para análise por cromatografia em fase gasosa. O produto químico em estudo presente no coletor pode ser determinado por via analítica.

O ensaio é efetuado em duas fases. Na primeira fase, as unidades são utilizadas sem lamas, mas com águas residuais sintéticas, sendo o produto químico em estudo bombeado para o tanque de arejamento. São colhidas amostras de afluente, efluente e de gases libertados e analisadas para deteção do produto químico em estudo, durante alguns dias. A percentagem (R_{vs}) deste removida do sistema pode calcular-se a partir dos dados recolhidos.

Em seguida, realiza-se o ensaio biológico normal (com lamas), em condições operacionais idênticas às utilizadas no ensaio de remoção. Efetuam-se também medições do COD ou da CQO, para verificar se as unidades estão a funcionar de forma eficaz. Ocasionalmente, efetua-se análises para determinar a concentração de produto químico em estudo no afluente, no efluente e nos gases libertados, na primeira parte do ensaio; após a aclimatação, efetua-se análises com uma maior frequência. É igualmente possível calcular, a partir dos dados no estado estacionário, a percentagem de eliminação do produto químico em estudo da fase líquida (R_T) por todos os processos (físicos e biológicos), bem como a proporção removida do sistema (R_V).

▼M4

Cálculos:

a) No ensaio não biológico, a percentagem (R_{VP}) de produto químico em estudo removido do sistema pode calcular-se com base na fórmula:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

em que

R_{VP} = remoção do produito químico em estudo por volatilização (%),

S_{VP} = produto químico em estudo recolhido no coletor, expresso em concentração equivalente na fase líquida (mg/l),

S_{IP} = concentração do produto químico em estudo no afluente (mg/l).

b) No ensaio biológico, a percentagem (R_V) de produto químico em estudo removida do sistema pode calcular-se com base na fórmula:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

em que

R_V = remoção do produto químico em estudo por volatilização, no ensaio biológico (%)

S_V = produto químico em estudo recolhido no coletor, no ensaio biológico, expresso em concentração equivalente no afluente líquido (mg/l),

S_I = concentração do produto químico em estudo no afluente (mg/l).

c) No ensaio biológico, a percentagem (R_T) de produito químico em estudo removida por todos os processos é dada por:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

em que

S_E = concentração de produto químico em estudo no efluente líquido (mg/l).

d) Assim, a percentagem (R_{BA}) removida por biodegradação e adsorção é calculada da seguinte forma:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Deve realizar-se ensaios separados para determinar se o produto químico em estudo é adsorvido; se for o caso, pode efetuar-se uma nova correção.

e) Uma comparação entre a proporção de produto químico em estudo removida nos sistemas de ensaio biológico (R_v) e não biológico (R_{vp}) indica os efeitos globais do tratamento biológico na emissão da produto para a atmosfera.

Exemplo: Benzeno

Tempo de retenção nas lamas = 4 dias

Tempo de retenção nas águas residuais sintéticas = 8 horas

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

▼**M4**

Assim,

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % e R_{BA} = 85 %.

Conclui-se que o benzeno não é adsorvido pelas lamas.

REFERÊNCIAS

(1) Horn J.A., Moyer J.E., Hale J.H. (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

(2) Pitter P., Chudoba J. (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover E.L., Kincannon D.F. (1983): Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(5) Capítulo C.4 deste anexo:"Determinação da biodegradabilidade 'fácil' ".

▼M4

Apêndice 6

Efeitos do tempo de retenção das lamas (SRT) na capacidade de tratamento dos produtos químicos

INTRODUÇÃO

1. O método descrito no texto principal foi concebido para verificar se os produtos químicos sujeitos a ensaio (geralmente aqueles cuja biodegradabilidade inerente é conhecida, mas não a "fácil") podem ser biodegradados nos limites impostos nas estações de tratamento de águas residuais. Os resultados são expressos em termos de percentagem de remoção e percentagem de biodegradação. As condições de funcionamento das unidades de lamas ativadas e a escolha do afluente permitem grandes variações de concentração do produto químico em estudo no efluente. Os ensaios são efetuados apenas com uma concentração nominal de lamas sólidas ou um tempo de retenção nominal (SRT); os caudais de remoção das lamas descritos podem causar variações consideráveis do SRT durante o ensaio, tanto de dia para dia como num determinado dia.

2. Nesta variante (1) (2), o SRT é mantido entre limites muito mais estreitos em cada período de 24 horas (tal como acontece em grande escala), o que resulta numa concentração mais constante nos efluentes. Recomenda-se a utilização de águas residuais domésticas, que proporciona uma percentagem de remoção mais constante e elevada. Além disso, investigam-se os efeitos de uma série de valores de STF; num estudo mais pormenorizado, podem estudar-se os efeitos da variação da temperatura na concentração do efluente.

3. Ainda não há consenso quanto aos modelos cinéticos implicados na biodegradação nas condições de tratamento de águas residuais. O modelo de Monod de crescimento bacteriano e a utilização do substrato foram selecionados (1)(2) para aplicação aos dados recolhidos, uma vez que o método se destinava a ser aplicado apenas a produtos químicos produzidos em grandes quantidades, que produziam concentrações superiores a 1 mg/l nas águas residuais. A validade do modelo simplificado e os pressupostos assumidos foram estabelecidos por recurso a uma série de etoxilatos de etilo com diversos graus de biodegradabilidade primária (2)(3).

Nota: Este método alternativo segue de perto o método descrito (C.10-A), apenas diferindo nos aspetos que se indicam de seguida.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

4. Utiliza-se unidades de vasos porosos com lamas ativadas, concebidas para facilitar a remoção quase contínua do meio fluido misto, de forma a permitir um controlo muito preciso do tempo de retenção das lamas (SRT, ou θ_s), de modo não interligado, numa determinada gama de SRT e, eventualmente, numa determinada gama de temperaturas. Em geral, o tempo de retenção é de 2 a 10 dias, a uma temperatura compreendida entre 5 e 20 °C. As águas residuais, de preferência domésticas, e uma solução do produto químico em estudo são colocadas separadamente nas unidades a caudais que proporcionem o tempo de retenção requerido (três a seis horas) e a concentração requerida do produto no afluente. Paralelamente, para fins comparativos, utilizam-se unidades de controlo sem adição do produto químico em estudo.

5. Pode utilizar-se outros tipos de equipamentos, devendo porém fazer-se o possível para assegurar o controlo dos SRT. Por exemplo, no caso de instalações munidas de um decantador, pode ser necessário ter em conta a perda de sólidos através dos efluentes. Além disso, deve tomar-se precauções especiais para evitar erros atribuíveis à variação da quantidade de lamas no decantador.

▼M4

6. Faz-se funcionar as unidades com cada conjunto selecionado de condições; ao atingir o equilíbrio, medem-se as concentrações estacionárias médias do produto químico em estudo e, eventualmente, o COD nos efluentes, num período de cerca de três semanas. Além de avaliar a percentagem de remoção do produto químico em estudo e, opcionalmente, o COD, determina-se, na forma de gráfico, a relação entre as condições de funcionamento da instalação e a concentração do produto no efluente. A partir do gráfico, pode calcular-se as constantes cinéticas e prever-se as condições de processamento do produto químico em estudo.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

7. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 12 e 13.

NÍVEIS DE APROVAÇÃO

8. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 14 e 15.

SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

9. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, ponto 16.

REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS

10. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 17 e 18.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Dispositivos

11. O sistema de vasos porosos modificado (apêndice 6.1) constitui uma unidade adequada. Consiste num recipiente interno (ou revestimento) de polipropileno poroso com 3,2 mm de espessura e porosidade aproximada 90 μm, com juntas soldadas topo a topo, o que torna esta unidade mais robusta do que a descrita no ponto 21 do presente capítulo, C.10-A. O revestimento é colocado num recipiente exterior de polietileno impermeável, composto por duas partes, designadamente uma base circular em que se abrem orifícios destinados a receber duas linhas de ar e um tubo para remoção das lamas, e um cilindro superior aparafusado à base, com uma saída posicionada de forma a proporcionar um volume conhecido (3 l) ao recipiente de vasos porosos. Uma das condutas de ar é munida de uma pedra difusora; a outra tem uma extremidade aberta, estando posicionada perpendicularmente à pedra no recipiente. Este sistema produz a agitação necessária para assegurar a mistura completa do conteúdo do vaso, bem como concentrações de oxigénio dissolvido superiores a 2 mg/l.

12. As unidades, em número adequado, são mantidas a temperaturas controladas na gama 5-20 °C (± 1 °C), quer por meio de banhos-maria quer mantendo a temperatura da zona a um nível constante. São necessárias bombas para transferir a solução Do produto químico em estudo, bem como as águas residuais decantadas, para os recipientes de arejamento, com o caudal requerido (0-1,0 ml/min e 0-25 ml/min, respetivamente), e uma terceira bomba para remover os resíduos de lamas dos recipientes de arejamento. O necessário caudal muito baixo de resíduos de lamas é obtido por recurso a uma bomba fixada a um caudal mais elevado, funcionando de forma intermitente sob o comando de um temporizador (por exemplo, 10 segundos por minuto, com um caudal de 3 ml/min, produzindo, assim, uma taxa de remoção de 0,5 ml/min).

Dispositivo de filtração ou centrifugação

13. Aplica-se o descrito no capítulo C10 A, ponto 23.

Equipamento de análise

14. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, ponto 24.

Água

▼**M4**

15. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 25 e 26.

Meio orgânico

16. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, ponto 27.

Águas residuais sintéticas

17. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, ponto 28.

Águas residuais domésticas

18. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, ponto 29.

Lamas ativadas

19. Aplica-se o descrito no capítulo C10 A, ponto 30.

Soluções-mãe do produto químico em estudo

20. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 31 e 32.

PROCEDIMENTO

Preparação do inóculo

21. Aplica-se o descrito no capítulo C.10, ponto 34 — utilizar lamas ativadas (cerca de 2,5 g/l).

Número de unidades de ensaio

22. Para um ensaio simples, ou seja, para medir a percentagem de eliminação, apenas é necessário um STF; contudo, para obter os dados necessários ao cálculo das constantes cinéticas, deve dispor-se de 4 ou 5 valores de STF. Selecionam-se, em geral, valores compreendidos entre 2 e 10 dias. Na prática, é conveniente realizar em simultâneo um ensaio com 4 ou 5 SRT, a uma dada temperatura, em estudos mais aprofundados, utilizam-se os mesmos SRT, ou, eventualmente, uma gama diferente de valores, a outras temperaturas na gama 5-20 °C. Para a biodegradação primária (principal utilização), apenas se necessita, em geral, de uma unidade por conjunto de condições. No entanto, para a determinação da biodegradabilidade final, é necessária, para cada conjunto de condições, uma unidade de controlo que processe as águas residuais sem o produto químico em estudo. Caso se suponha que este está presente nas águas residuais utilizadas, é necessário recorrer a unidades de controlo para avaliar a biodegradação primária e efetuar as necessárias correções nos cálculos.

Introdução do meio orgânico e do produto químico em estudo

23. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 36 a 39; de salientar, contudo, que o produto químico em estudo é adicionado separadamente e que são utilizados vários caudais de remoção de lamas. Controlar e ajustar também frequentemente, se necessário, com uma precisão de 10 %, os caudais dos afluentes, dos efluentes e da remoção de lamas, por exemplo, duas vezes por dia. Se surgirem dificuldades com os métodos analíticos ao utilizar águas residuais domésticas, realizar o ensaio com o efluente sintético, garantindo, porém, que os meios diferentes originam dados cinéticos comparáveis.

Processamento das lamas ativadas

24. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 40 a 43, controlando, porém, o SRT através da eliminação constante de lamas.

Amostragem e análise

25. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 44 a 50, determinando obrigatoriamente a concentração do profuto químico em estudo e, facultativamente, o COD; não deve utilizar-se a CQO.

▼**M4**

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

26. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 52 a 54.

Apresentação dos resultados do ensaio

27. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 56 a 62.

Cálculo das constantes cinéticas

28. É mais realista exprimir a concentração média do produto químico em estudo no efluente, no estado estacionário, e descrever o modo como varia, nas condições de funcionamento da instalação, do que exprimir a percentagem de biodegradação primária. Para tal, pode recorrer-se à equação (6) do apêndice 6.2, que pode fornecer valores para os parâmetros K_S, μ_m e θ_{SC}, tempo crítico de retenção das lamas.

(em alternativa, podem obter-se valores de K_S e μ_m utilizando um programa informático simples que adapte aos valores experimentais obtidos a curva teórica determinada a partir da equação 2 (apêndice 6.2). Embora a solução obtida não seja única, pode obter-se um valor aproximado razoável dos parâmetros K_S e μ_m).

Variabilidade dos resultados

29. Sabe-se pela experiência que cada produto químico produz valores diferentes de parâmetros cinéticos. Pensa-se que as condições de cultivo das lamas, bem como as condições de ensaio utilizadas (cf. ponto 5 e outros ensaios), influenciam de modo considerável os valores obtidos. Um aspeto desta variabilidade foi debatido por Grady *et al.* (4), que sugeriram a utilização dos termos "permanentes" e "intrínsecas" para qualificar duas condições extremas que representam os limites do estado fisiológico de uma cultura durante um ensaio cinético. Se não forem possíveis mudanças de estado durante o ensaio, os valores dos parâmetros cinéticos refletem as condições do ambiente do qual foram extraídos os microrganismos; estes valores são chamados "permanentes". No extremo oposto, se as condições de ensaio forem de molde a permitir o pleno desenvolvimento do sistema de síntese proteica que proporcione a taxa de crescimento máxima, os parâmetros cinéticos obtidos são "intrínsecos" e apenas dependentes da natureza do substrato e dos tipos de bactérias na cultura. A título de orientação, os valores existentes são obtidos mantendo um rácio baixo (por exemplo, 0,025) de concentração do substrato para microrganismos adequados (S_o/X_o), surgindo os valores intrínsecos quando o rácio é elevado (por exemplo, não inferior a 20). Em ambos os casos, o valor S_o deve ser igual ou superior ao valor de Ks (constante de auto-saturação).

30. A variabilidade, juntamente com outros aspetos da cinética da biodegradação, foi debatida num seminário recente da SETAC (5). Esses estudos, realizados ou projetados, permitirão uma visão mais clara da cinética dos processos nas estações de tratamento de águas residuais, tendo em vista uma melhor interpretação dos dados existentes e propor modelos mais adequados para os futuros métodos de ensaio.

REFERÊNCIAS:

(1) Birch R.R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII *Jornado Com. Español Deterg*.: 33-48.

(2) Birch R.R. (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.

(3) Birch R.R. (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. *J. Chem. Tech. Biotechnol*., 50: 411-422.

▼**M4**

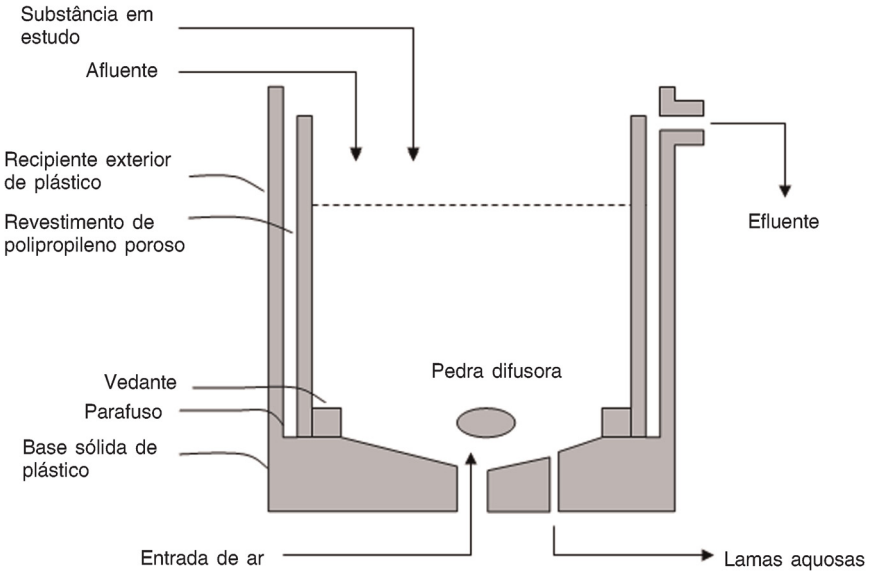
(4) Grady C.P.L., Smets B.F., Barbeau D.S. (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. *Wat. Res*., 30 (3): 742-748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop realizado em Port Sunlight, Reino Unido. Eds. Hales S.G., Feitjel T., King H., Fox K., Verstraete W. 4-6 Set. 1996. SETAC- Europe, Bruxelas.

▼M4

Apêndice 6.1

Vaso poroso com controlo do SRT



▼M4

Apêndice 6.2

Cálculo das constantes cinéticas

1. Assumindo a aplicabilidade da cinética de Monod e um equilíbrio de massas dos sólidos ativos e do substrato no sistema de lamas ativadas (1), podem obter-se as seguintes expressões para os estados estacionários:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

ou

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

em que

S_1 = concentração de substrato no efluente (mg/l)

K_S = constante de meia saturação (concentração à qual $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = taxa de crescimento específica (d^{-1})

μ_m = valor máximo de μ_m (d^{-1})

K_d = taxa de eliminação específica dos sólidos ativos (d^{-1})

θ_S = tempo médio de retenção das lamas, SRT (d)

O exame desta equação conduz às seguintes conclusões:

a concentração do efluente é independente da do afluente (S_0); por conseguinte, a percentagem de biodegradação varia com a concentração do efluente, S_0;

o único parâmetro de controlo da instalação que afeta a concentração S_1 é o tempo de retenção das lamas, θ_S;

a cada concentração no afluente, S_0, corresponde um tempo crítico de retenção das lamas, da seguinte forma:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

em que

θ_{SC} = tempo crítico de retenção das lamas, abaixo do qual os microrganismos competentes são eliminados da instalação.

uma vez que os outros parâmetros da equação (2) estão associados à cinética do crescimento, a temperatura é suscetível de afetar o nível de substrato no efluente e o tempo de permanência crítico das lamas, ou seja, o tempo de retenção das lamas necessário para obter um certo nível de tratamento aumenta à medida que diminui a temperatura.

2. A partir de um equilíbrio de massas de sólidos no sistema de vasos porosos, e partindo do princípio de que a concentração de sólidos no efluente da instalação, X_2, é reduzido em comparação com a do tanque de arejamento, X_1, o tempo de retenção das lamas é dado por:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼M4

e

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

em que

V = volume do tanque de arejamento (l)

X_1 = concentração de sólidos no tanque de arejamento (mg/l)

X_2 = concentração de sólidos no efluente (mg/l)

Q_0 = caudal do afluente (l/d)

Q_1 = caudal dos resíduos de lamas (l/d)

É, pois, possível manter o tempo de retenção das lamas a um determinado valor pré-selecionado através do controlo do caudal dos resíduos de lamas, Q_1.

Conclusões

3. O principal objetivo do ensaio consiste em permitir prever a concentração do efluente e, por conseguinte, os níveis do produto químico em estudo nas águas recetoras.

4. Representando graficamente S_1 *versus* θ_S, pode, por vezes, avaliar-se rapidamente o tempo crítico de retenção das lamas, θ_{SC} (exemplo: curva 3 da figura 1). Se tal não for possível, pode calcular-se θ_{SC}, obtendo também valores aproximados de μ_m e K_S, representando S_1, *versus* $S_1 \cdot \theta_S$.

Rearranjando a equação (1), obtém-se

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Se o valor K_d for baixo, $1 + \theta_s \cdot K_d \sim 1$ e a equação [5] assume a forma:

$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

O gráfico deve, pois, ser uma linha reta (figura 2) de declive $1/\mu_m$ e ordenada na origem K_S/μ_m; além disso, $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

Figura 1

Três temperaturas; cinco SRT

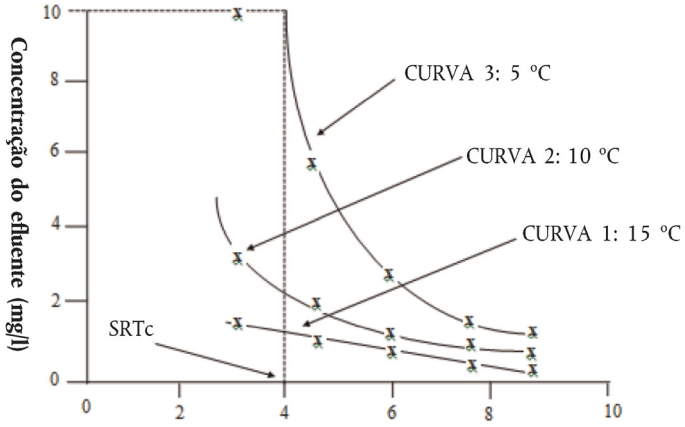
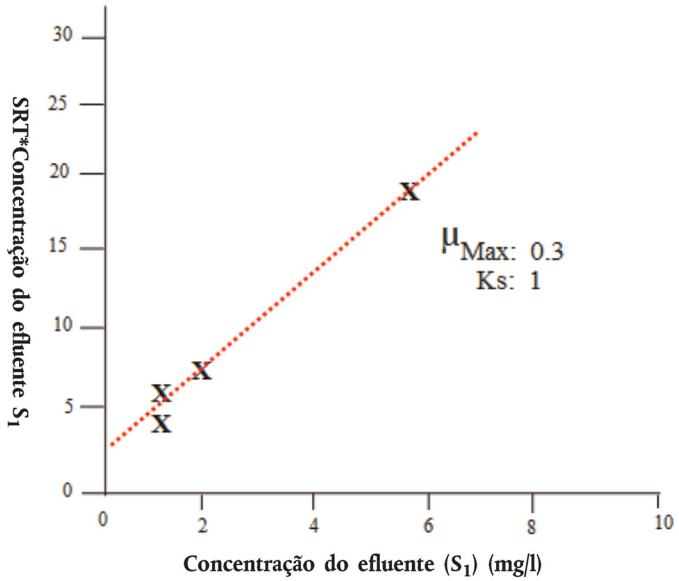


Figura 2

Regressão linear SRT · S_1 *versus* S_1 (T = 5 °C)



Glossário:

Concentração do efluente

Curva

▼M4

Apêndice 7

ENSAIO NUMA GAMA BAIXA DE CONCENTRAÇÕES (µg/l)

1. Muitos produtos químicos encontram-se presentes no meio aquático, inclusive nas águas residuais, a muito baixas concentrações (µg/l). Nessas concentrações, não podem, provavelmente, constituir substratos primários para o crescimento bacteriano, mas é maior a probabilidade de se decomporem como substratos secundários, em competição com uma vasta gama de compostos de carbono de ocorrência natural. A decomposição desses produtos não se adapta, pois, ao modelo descrito no apêndice 6. Existem vários modelos suscetíveis de serem aplicados e, nas condições inerentes aos sistemas de tratamento de águas residuais, pode utilizar-se mais de um sistema em simultâneo. É necessário prosseguir a investigação com vista a elucidar esta questão.

2. Entretanto, pode seguir-se o procedimento descrito no texto principal (capítulo C.10-A), mas apenas no respeitante à biodegradabilidade primária, utilizando uma gama adequada de baixas concentrações (< 100 µg/l) e um procedimento analítico validado. A percentagem de biodegradação pode ser calculada (ponto 54 do método de ensaio) tendo em conta os processos abióticos (adsorção, volatilidade etc.). Nyholm e seus colaboradores (1)(2) realizaram um estudo utilizando um ciclo de 4 h num sistema "enchimento--esvaziamento", tendo comunicado a obtenção de constante de pseudo-primeira ordem para cinco produtos químicos adicionados a um efluente sintético (5 a 100 µg/l). No caso da biodegradabilidade final, podem utilizar-se substâncias marcadas com ^{14}C. A descrição deste procedimento excede o âmbito do presente método de ensaio, dado não existirem ainda procedimentos aprovados, embora tenha sido proposto um método (ISO 14592 (3)) que contém orientações para a utilização de produtos químicos marcadas com ^{14}C.

Ensaio SCAS

3. Posteriormente, foi proposto um ensaio mais simples, em duas fases (4)(5)(6); o método semi-contínuo das lamas ativadas (*semi-continuous activated sludge* - SCAS) é seguido de ensaios cinéticos curtos com amostras colhidas nas unidades SCAS. Contrariamente ao método de ensaio original C.12, o sistema SCAS funciona com caudais conhecidos de remoção de lamas e utiliza águas residuais sintéticas OCDE ou águas residuais domésticas. Em virtude da variabilidade do pH e da reduzida decantabilidade das lamas, as águas residuais sintéticas são modificadas por adição de tampão de fosfatos, extrato de levedura, cloreto de ferro (III) e quantidades vestigiais de sais, sendo a sua CQO aumentada para cerca de 750 mg/l através do reforço da concentração de peptona e extrato de carne. As unidades funcionam num ciclo de 24 h: arejamento durante 23 h, remoção das lamas, decantação, remoção do sobrenadante (efluente) seguida de adição das águas residuais sintéticas com o produto químico em estudo, até perfazer 100 µg/l, (aproximadamente a mesma concentração utilizada no ensaio curto). Uma vez por semana, 10 % das lamas totais substituem-se por lamas recentes, para manter o equilíbrio da população microbiana.

4. Determinan-se as concentrações inciais e finais do produto químico em estudo no início e no final da fase de arejamento, prosseguindo-se o ensaio até se alcançar uma remoção constante do profuto químico, o que pode levar de uma semana a vários meses.

Ensaio curto

5. Efetua-se um ensaio curto (p.ex., oito horas) para determinar a constante cinética de pseudo-primeira ordem para a eliminação do produto químico em estudo em lamas ativadas com origens e historiais conhecidos mas diferentes. São colhidas, nomeadamente, amostras de lamas dos reatores SCAS, no termo de um período de arejamento (em que a concentração de substrato orgânico é baixa), num ensaio de aclimatação (pontos 3 e 4). Podem também recolher-se lamas de uma unidade SCAS paralela não exposta ao produto químico em estudo, para fins comparativos. Procede-se ao arejamento de

▼M4

misturas de lamas e do produto químico em estudo, adicionado em duas ou mais concentrações na gama 1-50 μg/l, sem águas residuais sintéticas ou outro substrato orgânico. O produto químico em estudo remanescente na solução é determinado a intervalos regulares (p.ex. de hora a hora), consoante a sua degradabilidade, por um período não superior a 24 h. As amostras são centrifugadas antes de sujeitas a análise adequada.

Cálculos

6. Os dados das unidades SCAS são utilizados para calcular a percentagem de remoção do produto químico em estudo (ponto 54). Por outro lado, a constante média de velocidade, K_1, (corrigida para ter em conta a concentração de sólidos em suspensão) pode ser calculada do seguinte modo:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln\frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

em que

t = tempo de arejamento (23 h)

C_e = concentração no final do período de arejamento (μg/l)

C_i = concentração no início do arejamento (μg/l)

SS = concentração de sólidos nas lamas ativadas (g/l)

7. No ensaio curto, o logaritmo da concentração percentual remanescente é representado em função do tempo; o declive da parte inicial (10-50 % de degradação) da curva é equivalente a K_1, constante de pseudo-primeira ordem. Esta é corrigida para ter em conta a concentração de sólidos nas lamas dividindo o declive por esta última concentração. Os resultados comunicados devem incluir pormenores relativos às concentrações iniciais de produto químico em estudo e de sólidos em suspensão, ao tempo de retenção das lamas, à origem e à carga destas e, se pertinente, à exposição prévia ao produto químico em estudo.

Variabilidade dos resultados

8. A variabilidade, juntamente com outros aspetos da cinética da biodegradação, foi debatida num seminário recente da SETAC (7). Esses estudos, realizados ou projetados, permitirão uma visão mais clara da cinética dos processos nas estações de tratamento de águas residuais, tendo em vista uma melhor interpretação dos dados existentes e propor modelos mais adequados para os futuros métodos de ensaio.

REFERÊNCIAS

(1) Nyholm N., Jacobsen B.N., Pedersen B.M., Poulsen O., Dambourg A., Schultz B. (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. *Wat. Res*. 26: 339-353.

(2) Jacobsen B.N., Nyholm N., Pedersen B.M., Poulsen O., Ostfeldt P. (1993): Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. *Wat. Res*. 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

(4) Nyholm N., Ingerslev F., Berg U.T., Pedersen J.P., Frimer-Larsen H. (1996): Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations *Chemosphere* 33 (5): 851-864.

(5) Berg U.T., Nyholm N. (1996): Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. *Chemosphere* 33 (4): 711-735.

(6) Danish Environmental Protection Agency: (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, U.T. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997): *Workshop* realizado em Port Sunlight, Reino Unido. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K., Verstraete, W. 4-6 Set. 1996. SETAC- Europe, Bruxelas.

▼M4

C.10-B: Biofilmes

INTRODUÇÃO

1. Em geral, os ensaios de simulação aplicam-se a produtos químicos não aprovados num ensaio de rastreio da biodegradabilidade imediata [capítulo C.4, A a F, do presente anexo (9)], mas aprovados num ensaio de biodegradabilidade inerente. Excecionalmente, os ensaios de simulação podem também aplicar-se a qualquer produto químico em relação ao qual sejam necessárias mais informações, em especial produtos químicos produzidas em grandes quantidades, para o que se recorre, em geral, a um ensaio de lamas ativadas (C.10-A). Em alguns casos, contudo, são necessárias informações específicas sobre o comportamento de um produto químico com a aplicação de métodos de tratamento de águas residuais com recurso a biofilmes, nomeadamente filtros percoladores ou biológicos, contratores rotativos biológicos e leitos fluidizados. Para tal, foram desenvolvidos vários dispositivos.

2. Gerike *et al.* (1) utilizaram filtros biológicos de grandes dimensões, à escala-piloto, em modo interligado. Estes filtros ocupam muito espaço e necessitam de volumes relativamente elevados de águas residuais, sintéticas ou não. Truesdale *et al.* (2) descreveram um sistema que utiliza filtros mais pequenos (6 pés x 6 polegadas de diâmetro), alimentados com águas residuais naturais isentas de tensioativos, mas que requerem, mesmo assim, volumes elevados. Podem ser necessárias 14 semanas para a "maturação" de um bifilme e 4 a 8 semanas adicionais, após a primeira introdução do tensioativo em estudo, para que se registe aclimatação.

3. Baumann *et al.* (3) desenvolveram um filtro muito mais pequeno de poliéster "aveludado" previamente embebido em lama ativada (suporte inerte). O produto químico em estudo constitui a única fonte de carbono; a biodegradabilidade é avaliada através de determinações do carbono orgânico dissolvido (COD) no afluente e no efluente, bem como da quantidade de CO_2 nos gases libertados.

4. Gloyna *et al.* (4) utilizaram uma abordagem radicalmente diferente, tendo inventado o reator tubular rotativo. Procedeu-se à cultura de um biofilme na superfície interna do tubo rotativo, mediante passagem de afluente introduzido no topo do tubo, inclinado num ângulo ligeiro relativamente à horizontal. O reator foi utilizado para estudar a biodegradabilidade dos tensioativos (5), bem como para investigar a espessura ótima do biofilme e a difusão através do mesmo (6). Posteriormente, estes autores introduziram aperfeiçoamentos no reator, alterando-o, nomeadamente para poderem determinar o CO_2 nos gases libertados.

5. O reator tubular rotativo foi desenvolvido pelo *Standing Committee of Analysts* (Reino Unido) como método-padrão para avaliar a biodegradabilidade de produtos químicos (7) e a tratabilidade e toxicidade das águas residuais (8). O método que se descreve tem como vantagens a simplicidade, a compacidade, a reprodutibilidade e a necessidade de quantidades relativamente baixas de meio orgânico.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

6. As águas residuais, sintéticas ou domésticas, e o produto quíimico em estudo, simples ou em mistura, entram em contacto com a superfície interna de um tubo rotativo ligeiramente inclinado. Assiste-se à formação, na superfície interna, de uma camada de microrganismos semelhante à que se observa nos biofiltros. As condições de funcionamento do reator são escolhidas de forma a proporcionarem uma eliminação adequada da matéria orgânica e, se necessário, a oxidação do ião amónio.

▼M4

7. Recolhe-se o efluente do tubo, que é decantado e/ou filtrado antes da determinação do COD e/ou do produto químico em estudo por um método específico. As unidades de controlo que não utilizam o produto químico em estudo funcionam em paralelo, nas mesmas condições, para fins comparativos. Considera-se que a diferença entre as concentrações de COD nos efluentes das unidades de ensaio e de controlo é devida ao produto químico em estudo e aos seus metabolitos orgânicos. Esta diferença é comparada com a concentração do produto químico em estudo adicionado (expressa em COD), para o cálculo da eliminação deste.

8. Em princípio, é possível distinguir-se a biodegradação da bioadsorção através de um exame cuidadoso da curva eliminação *versus* tempo. Em geral, pode obter-se a confirmação por recurso a um ensaio de biodegradação rápida (consumo de oxigénio ou produção de dióxido de carbono), utilizando um inóculo aclimatado colhido, no final do ensaio, nos reatores nos quais foi adicionado o produto químico em estudo.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

9. A pureza, a solubilidade em água, a volatilidade e as características de adsorção Do produto químico devem ser conhecidas, a fim de permitir a interpretação correta dos resultados.

10. Em geral, os produtos químicos voláteis e pouco solúveis não podem ser testados, salvo se forem tomadas precauções especiais (ver o capítulo C.10-A, apêndice 5). A estrutura química ou, pelo menos, a fórmula empírica, devem também ser conhecidas para o cálculo dos valores teóricos e/ou a confirmação dos valores medidos dos parâmetros, como, por exemplo, a carência teórica de oxigénio (CTeO) e o COD.

11. O facto de se dispor de informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo para os microrganismos (ver o capítulo C.10-A, apêndice 4) pode ser útil para selecionar concentrações de ensaio adequadas e pode ser essencial para a interpretação correta de valores baixos de biodegradação.

NÍVEIS-LIMITE

12. No passado, os tensioativos tinham de apresentar uma biodegradação primária de, pelo menos, 80 %, para que os produtos pudessem ser comercializados. Para percentagens inferiores, pode recorrer-se ao presente ensaio de simulação (confirmação) e o tensioativo só pode ser comercializado se remover mais de 90 % do produto químico em causa. Com a generalidade dos produtos químicos, não se coloca a questão de exceder ou de não atingir a percentagem de remoção obtida, que pode ser utilizada no cálculo aproximado da concentração ambiental provável a utilizar na avaliação dos riscos dos produtos químicos. Numa série de estudos de produtos químicos puros, observou-se uma percentagem de remoção de COD superior a 90 % em mais de três quartos das amostras e superior a 80 % em mais de 90 % das produtos que revelaram um grau significativo de biodegradabilidade.

SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

13. A fim de garantir a execução correta do processo experimental, é importante submeter a ensaios ocasionais substâncias de referência de comportamento conhecido. Essas substâncias incluem o ácido adípico, o 2-fenilfenol, o 1-naftol, o ácido difénico e o ácido 1-naftóico.

REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS

14. Um laboratório no Reino Unido obteve os valores de 3,5 % para o desvio-padrão relativo intra-ensaios e de 5 % para o mesmo parâmetro inter-ensaios (7).

▼M4

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Equipamento

Reatores tubulares rotativos

15. O dispositivo (ver figuras 1 e 2 no apêndice 8) é constituído por um conjunto de tubos acrílicos, cada um dos quais com 30,5 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro interno, suportados por rodas revestidas com borracha num suporte metálico. Cada tubo tem um entalhe exterior, com cerca de 0,5 cm de profundidade, para encaixe nas rodas; a superfície interna é endurecida com um fio de lã grosseira e existe um rebordo com 0,5 cm de profundidade na extremidade superior (alimentação) para reter o líquido. Os tubos estão inclinados num ângulo de aproximadamente um grau em relação à horizontal, de forma a proporcionar o tempo de contacto necessário quando o meio de ensaio é introduzido num tubo limpo. As rodas revestidas com borracha rodam por ação de um motor de velocidade lenta ajustável. A temperatura dos tubos é controlada por instalação num compartimento com temperatura constante.

16. Introduzindo cada reator tubular num tubo ligeiramente maior, tapado, e assegurando a impermeabilidade gasosa das vedações, é possível recolher numa solução alcalina o CO_2 libertado, para posterior determinação (6).

17. Durante 24 horas, introduz-se em cada tubo meio orgânico, se for caso disso com o produto químico em estudo, armazenado num recipiente de 20 l (a) (ver a figura 2). Se necessário, a solução do produto químico em estudo pode ser introduzida separadamente. Cada recipiente de armazenagem apresenta, junto do fundo, um orifício do qual sai um tubo de um material adequado (por exemplo, de borracha de silicone), que, passando por uma bomba peristáltica (b), se liga a um tubo adutor de vidro ou de um material acrílico, o qual se liga 2-4 cm acima da extremidade mais elevada (de alimentação) do tubo inclinado (C). O efluente sai pela extremidade inferior do tubo inclinado, sendo recolhido noutro recipiente de armazenagem (D). É decantado ou filtrado antes da análise.

Dispositivo de filtração-centrifugação

18. Dispositivo de filtração das amostras com filtros de membrana de porosidade adequada (diâmetro nominal da abertura: 0,45 m), que adsorva produtos químicos orgânicos solúveis ou liberte uma quantidade mínima de carbono orgânico. Caso se utilizem filtros que libertem carbono orgânico, lavá-los cuidadosamente com água quente, para eliminar o carbono orgânico lixiviável. Em alternativa, pode utilizar-se uma centrifugadora que produza 40 000 m/s^2.

19. Equipamento analítico para a determinação dos seguintes parâmetros:

— COD/carbono orgânico total (COT) ou carência química de oxigénio (CQO),

— produto químico específico (por HPLC, cromatografia em fase gasosa, etc.), se necessário,

— pH, temperatura, acidez, alcalinidade,

— amónio, nitritos e nitratos, se os ensaios forem executados em condições de nitrificação.

Água

20. Água da rede de abastecimento, com menos de 3 mg/l de COD.

21. Água destilada ou desionizada, com menos de 2 mg/l de COD.

▼M4

Meio orgânico

22. Podem ser utilizadas como meio orgânico águas residuais sintéticas, águas residuais domésticas ou uma combinação de ambas. Foi demonstrado que a utilização de águas residuais domésticas simples origina com frequência uma maior percentagem de remoção de COD em unidades de lamas ativadas, permitindo mesmo a biodegradação de alguns produtos químicos que não sofrem biodegradação quando se utiliza o efluente sintético OCDE. Recomenda-se, pois, a utilização de águas residuais domésticas. Determinar a concentração de COD (ou a CQO) de cada novo lote de meio orgânico. Deve conhecer-se a acidez ou a alcalinidade deste. Se a acidez ou a alcalinidade do meio orgânico for baixa, pode ser necessário adicionar-lhe um tampão adequado (hidrogenocarbonato de sódio ou hidrogenofosfato de potássio), para manter o pH no reator a cerca de 7,5 ± 0,5, durante o ensaio. A quantidade de solução-tampão e o momento em que é adicionada devem ser decididos caso a caso.

Águas residuais sintéticas

23. Dissolver. por litro de água da torneira: 160 mg de peptona; 110 mg de extrato de carne; 30 mg de ureia; 28 mg de hidrogenofosfato dipotássico anidro (K_2HPO_4); 7 mg de cloreto de sódio (NaCl); 4 mg de cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2.2H_2O$); 2 mg de sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4.7H_2O$). O efluente sintético OCDE constitui um exemplo e proporciona uma concentração média de COD no afluente de cerca de 100 mg/l. Em alternativa, podem utilizar-se composições mais próximas das das águas residuais em estudo, com uma concentração idêntica de COD. O efluente sintético, numa forma concentrada, pode ter por base água destilada, e ser armazenado a cerca de 1 °C durante uma semana, no máximo. Se necessário, diluir com água da rede de abastecimento (embora este meio não seja satisfatório — por exemplo, a concentração de azoto é muito elevada e o teor de carbono relativamente baixo —, não foram sugeridas alternativas melhores, exceto a adição de mais fosfato, no tampão, e de uma quantidade suplementar de peptona).

Águas residuais domésticas

24. Utilizar águas residuais recentemente decantadas, recolhidas diariamente numa instalação de tratamento que processe predominantemente esgotos domésticos. A amostra deve ser recolhida da conduta de alimentação do tanque de decantação primária, ou da conduta de alimentação da instalação de lamas ativadas, e ter a menor quantidade possível de partículas grosseiras. As águas residuais podem ser utilizadas após terem sido armazenadas durante vários dias a cerca de 4 °C, caso apresentem provas de que o COD (ou a CQO) não baixou significativamente (ou seja, mais de 20 %) durante a armazenagem. A fim de limitar perturbações do sistema, o COD (ou a CQO) de cada novo lote deve ser ajustado, antes da utilização, para um valor constante, por exemplo, através de diluição com água da rede de abastecimento.

Lubrificante

25. Para a lubrificação dos rolos da bomba peristáltica, podem utilizar-se glicerol ou azeite; ambos são adequados para utilização com tubos de borracha de silicone.

Soluções-mãe do produto químico em estudo

26. Se a solubilidade dos produtos químicos for adequada, preparar soluções-mãe de reserva de concentrações adequadas (por exemplo, 1 a 5 g/l) em água desionizada, ou na fração mineral do efluente sintético. No caso de produtos químicos insolúveis, ver o apêndice 5 do capítulo C.10-A. Este método não é aplicável a produtos químicos voláteis sem alterações dos reatores tubulares (ponto 16). Determinar o COD e o COT da solução-mãe, repetindo as medições para cada novo lote. Se a diferença entre o COD e o COT for superior a 20 %, verificar a solubilidade em água do produto químico em estudo. Comparar com o valor nominal o COD ou a concentração do mesmo produto determinados por análise específica da solução-mãe, de forma a

▼M4

averiguar se a recuperação é suficiente (em geral, deve ser superior a 90 %). Verificar, em especial no caso das dispersões, se o COD pode ou não ser utilizado como parâmetro analítico, ou se é necessário utilizar uma técnica analítica específica para o produto químico em causa. No caso das dispersões, é necessário proceder à centrifugação das amostras. Para cada novo lote, determinar o COD, a CQO ou o produto químico em estudo por meio de uma análise específica.

27. Determinar o pH da solução-mãe. A ocorrência de valores extremos indica que a adição do produto químico pode influenciar o pH das lamas ativadas no sistema de ensaio. Neste caso, neutralizar a solução de reserva com pequenas quantidades de ácido ou de base, de forma a obter um pH de 7,0 ± 0,5, evitando, contudo, a precipitação do produto químico em estudo.

PROCEDIMENTO

Preparação do meio orgânico para determinação

28. Assegurar que os recipientes do afluente e do efluente, bem como a conduta entre o primeiro e o segundo, são bem limpos, de forma a eliminar qualquer proliferação de flora microbiana antes do ensaio e durante o mesmo.

29. Preparar o efluente sintético (ponto 23) diariamente, a partir dos sólidos ou da solução-mãe concentrada, por diluição adequada com água da rede de abastecimento. Medir, numa proveta, a quantidade necessária e adicionar a um recipiente limpo destinado a receber o afluente. Se necessário, juntar também a quantidade necessária de solução-mãe do produto químico em estudo e da substância de referência ao efluente sintético, antes de efetuar a diluição. Se for mais prático, ou necessário para evitar perdas do produto químico em estudo, preparar separadamente uma solução diluída desta em estudo num recipiente específico e aduzi-la aos tubos inclinados através de uma bomba doseadora.

30. Em alternativa (e de preferência), utilizar águas residuais domésticas decantadas (ponto 24) recolhidas diariamente, se possível.

Funcionamento dos reatores tubulares rotativos

31. Para a determinação de um produto químico em estudo, são necessários dois reatores tubulares idênticos, montados num compartimento a temperatura constante (em geral, 22 ± 2 °C).

32. Ajustar as bombas peristálticas para um caudal de 250 ± 25 ml/h do meio orgânico (sem o produto químico em estudo) para os tubos inclinados, que se fazem rodar a 18 ± 2 rpm. Lubrificar (ponto 25) os tubos de bombagem no início, bem como, periodicamente, ao longo do ensaio, de modo a assegurar o seu bom funcionamento e prolongar a sua vida útil.

33. Ajustar o ângulo de inclinação dos tubos relativamente à horizontal, de forma a obter um tempo de permanência adequado das matérias nos tubos limpos de 125 ± 12,5. Estimar o tempo de retenção, adicionando à matéria-prima um marcador não biológico (p.ex. NaCl ou um corante inerte): o tempo necessário para atingir a concentração máxima no efluente é considerado o tempo médio de retenção (se estiver presente uma quantidade máxima de filme, o tempo de retenção pode aumentar até cerca de 30 min).

34. Os referidos caudais, velocidades e tempos são aqueles que se verificou conduzirem a taxas de eliminação adequadas (> 80 %) de COD ou CQO e à produção de efluentes nitrificados. Se a taxa de eliminação for insuficiente, ou se pretender simular o desempenho de uma determinada estação de tratamento, o caudal deve ser alterado. Neste caso, ajustar o caudal de adição do meio orgânico até o desempenho do reator ser equivalente ao da estação de tratamento.

▼M4

Inoculação

35. Se forem utilizadas águas residuais sintéticas, a inoculação proprocionada pelo ar ambiente pode ser bastante para iniciar a proliferação dos microrganismos; se tal não for o caso, adicionar 1 ml/l de águas residuais decantadas à fonte de alimentação, durante 3 dias.

Medições

36. Verificar regularmente se os caudais e as velocidades de rotação se encontram dentro dos limites requeridos. Determinar também o pH do efluente, em especial se for previsível a ocorrência de nitrificação.

Amostragem e análise

37. O método, os padrões e a frequência da amostragem são escolhidos de acordo com o objetivo do ensaio. Colher, por exemplo, amostras pontuais do afluente e do efluente, ou colher amostras durante um período mais longo, por exemplo, 3-6 h. No primeiro período (sem o produto químico em estudo), colher amostras duas vezes por semana. Filtrar as amostras com membranas ou centrifugar a cerca de 40 000 m/s^2 durante cerca de 15 minutos (ponto 18). Pode ser necessário decantar as amostras e/ou filtrá-las com um filtro grosseiro antes da filtração com membrana. Determinar o COD, ou a CQO, pelo menos em duplicado, bem como, se necessário, a CBO, o amónio e os nitritos/nitratos.

38. As análises devem ser efetuadas o mais rapidamente possível após a colheita e a preparação das amostras. Se for necessário adiar a realização das análises, armazenar as amostras a cerca de 4 °C, na obscuridade, em garrafas hermeticamente fechadas. Se as amostras tiverem de ser armazenadas por um período superior a 48 horas, conservá-las por congelação, acidificação ou por adição de uma substância tóxica, por exemplo, 20 ml/l de solução a 10 g/l de cloreto de mercúrio (II). Assegurar que a técnica de conservação não influencia os resultados da análise.

Período de desenvolvimento

39. Neste período, a superfície do biofilme aumenta até atingir uma espessura ótima, o que leva, geralmente, cerca de 2 semanas, não devendo exceder seis semanas. A eliminação de COD ou de CQO (ponto 44) aumenta até atingir um valor estacionário. Quando tiver sido atingida a fase de patamar, registando-se em valor equivalente em ambos os tubos, seleciona-se um destes como testemunha para o resto do ensaio, durante o qual o seu desempenho deverá permanecer constante.

Introdução do produto químico em estudo

40. Adicionar ao outro reator, nesta fase, o produto químico em estudo na concentração requerida, geralmente da ordem de 10-20 mg C/l. O reator de controlo continua a processar apenas o meio orgânico.

Período de aclimatação

41. Continuar a realizar duas vezes por semana a análise do COD ou da CQO; caso se pretenda avaliar a biodegradabilidade primária, medir também a concentração do produto químico em estudo através de um método de análise específico. Prever de uma a seis semanas (ou, em condições especiais, um período mais longo) para a aclimatação, na sequência da introdução do produto químico em estudo. Quando a percentagem de remoção (pontos 43-45) atingir um valor máximo, obter 12-15 valores válidos na fase de patamar durante cerca de três semanas, para avaliação da percentagem de remoção média. Considera-se o ensaio concluído quando for obtido um nível de eliminação suficientemente elevado. A duração do ensaio não deve, em geral, exceder 12 semanas após a adição do produto químico em estudo.

▼M4

Eliminação de crostas do filme

42. A eliminação súbita de grandes quantidades de filme em excesso dos tubos (crostas) ocorre a intervalos relativamente regulares. Para garantir que a comparabilidade dos resultados não é afetada, os ensaios devem abranger, pelo menos, dois ciclos completos de cultura e eliminação de crostas.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

43. Calcular a percentagem de remoção do prpoduto químico em estudo, em termos de COD ou de CQO, para cada avaliação programada, por recurso à equação:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

em que

D_t = % de eliminação do COD ou da CQO no instante *t*

Cs = concentração de DOC (ou COD) no afluente devida ao produto químico em estudo, estimada, de preferência, a partir da concentração, em mg/l, da solução-mãe e do volume desta adicionado;

E = valor medido de COD ou CQO no efluente em estudo, no instante *t* (mg/l)

Eo = valor medido de COD ou CQO no efluente em estudo, no instante *t* (mg/l)

Repetir o cálculo para a substância de referência, se tiver sido utilizada.

Desempenho do reator-testemunha

44. O grau de eliminação (D_B) de COD ou de CQO do meio orgânico da unidade de controlo é uma informação útil para avaliar a atividade de biodegradação do biofilme durante o ensaio. Calcular a percentagem de eliminação por recurso à equação:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

em que

Cm = COD ou CQO do meio orgânico no afluente de controlo (mg/l)

45. Calcular a remoção (D_{ST}) do produto químico em estudo, se determinada por um método analítico específico, em cada instante, com base na equação:

$$DST = 100\ (1 - S_e/S_i)\ \%$$

em que

S_i = concentração medida ou (de preferência) estimada do produto químico em estudo no afluente (mg/l)

S_e = concentração medida ou estimada do produto químico em estudo no efluente, no instante *t* (mg/l)

▼M4

Se o método de análise conduzir a um valor positivo nas lamas inalteradas, equivalente a S_e mg/l, calcular a percentagem de eliminação (D_{SC}) com base na seguinte equação:

$$DSC = 100\ (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c)\ \%$$

Apresentação dos resultados do ensaio

46. Traçar o gráfico da percentagem de eliminação, D_t (ou D_{SC}) e D_{ST}, se for o caso, em função do tempo (ver o capítulo C.10-A, apêndice 2). Considerar a média (arredondada ao número inteiro mais próximo) e o desvio-padrão dos valores dos 12-15 valores de D_T (e de D_{ST}, se disponíveis) obtidos na fase de patamar como a percentagem de remoção do produto químico em estudo. A forma da curva de eliminação permite tirar algumas conclusões quanto aos processos de remoção.

Adsorção

47. Caso se observe uma elevada remoção de COD do produto químico em estudo no início do ensaio, o produto em causa é, provavelmente, removido por adsorção no biofilme. Esta suposição pode ser comprovada determinando a quantidade de produto adsorvido nos sólidos removidos do filme. Não é comum que a eliminação do COD das substâncias adsorvíveis permaneça elevada ao longo do ensaio; em geral, observa-se um elevado grau de eliminação no início, que baixa progressivamente para um valor de equilíbrio. Contudo, se a substância em estudo adsorvida tiver causado a aclimatação da flora microbiana, a eliminação do seu COD poderá aumentar posteriormente, estabilizando-se em valores elevados.

Fase de latência

48. Muitos produtos químicos em estudo passam por uma fase de latência, antes de ocorrer a biodegradação completa, nomeadamente nos ensaios estáticos de rastreio. Na fase de latência, ocorre a aclimatação ou adaptação das bactérias responsáveis pela degradação, não se observando praticamente qualquer remoção do produto; a proliferação das bactérias inicia-se em seguida. Esta fase termina, considerando-se que se inicia a fase de degradação, quando for removida cerca de 10 % da quantidade inicial de produto químico em estudo (após a adsorção, caso ocorra). Em geral, a fase de latência é muito variável e pouco reprodutível.

Fase de patamar

49. A fase de patamar da curva de eliminação de um ensaio contínuo é definida como a fase em que ocorre a degradação máxima. Deve durar, pelo menos, 3 semanas, durante as quais se devem determinar cerca de 12-15 valores válidos.

Grau de remoção médio do produto químico em estudo

50. Calcular o valor médio a partir dos valores de eliminação (D_t e D_{st}, se disponível) obtidos para o produto químico em estudo na fase de patamar. O grau de remoção do produto químico em estudo é arredondado ao número inteiro mais próximo (1 %). Recomenda-se também o cálculo do intervalo de confiança de 95 % do valor médio. Calcular do mesmo modo o grau médio (D_B) de eliminação do meio orgânico no recipiente de controlo.

▼M4

Indicação da biodegradação

51. Se o produto químico em estudo não for adsorvido de forma significativa pelo biofilme e a curva de eliminação tiver a forma característica de uma curva de biodegradação com fases de latência, degradação e patamar (pontos 48 e 49), a eliminação determinada pode ser atribuída com segurança à biodegradação. Se ocorrer uma elevada remoção inicial, o ensaio de simulação não permite distinguir os processos de eliminação biológicos dos abióticos. Nesses casos, e noutros casos em que existam dúvidas quanto a biodegradação (por exemplo, se ocorrer separação), analisar o produto químico em estudo adsorvido em amostras do filme ou efetuar mais ensaios estáticos de rastreio da biodegradabilidade com base em parâmetros que comprovem claramente os processos biológicos. Esses ensaios devem consistir em métodos baseados no consumo de oxigénio (capítulo C.4 do presente anexo D, E e F) (9) ou num teste que meça a produção de CO_2 (capítulo C.4-C do presente anexo, ou o método *headspace*) (10); utilizar como inóculo biofilme pré-exposto proveniente do reator adequado.

52. Se tiverem sido determinadas a remoção do COD e a eliminação de substâncias específicas, a ocorrência de diferenças significativas entre as percentagens (primeiro valor superior ao segundo) indicam a presença nos efluentes de substâncias orgânicas intermediárias cuja degradação pode ser mais difícil. Estas substâncias devem ser objeto de investigação.

Validade dos resultados

53. Considerar o ensaio válido se o grau de eliminação do COD (ou de CQO) (D_B) nas unidades de controlo for superior a 80 % após 2 semanas de funcionamento sem se observarem ocorrências relevantes.

54. Se a substância de referência utilizada apresentar uma biodegradabilidade "fácil", o grau de biodegradação deve ser > 90 % e a diferença entre os duplicados não deve exceder 5 %. Caso estes dois critérios não sejam satisfeitos, rever os procedimentos experimentais e/ou utilizar águas residuais domésticas de outra origem.

55. Do mesmo modo, as diferenças entre os valores de biodegradação das unidades em duplicado (se utilizadas) que processem um produto químico em estudo não devem divergir em mais de 5 %. Se este critério não for respeitado, mas a eliminação permanecer elevada, prosseguir a análise por um período de mais três semanas. Se a eliminação for baixa, investigar os efeitos inibidores do produto químico em estudo, caso não sejam conhecidos, e repetir o ensaio com uma concentração inferior do produto, se possível.

Relatório do ensaio

56. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produto químico em estudo:

— dados de identificação,

— natureza física e, quando pertinente, propriedades físico-químicas.

Condições de ensaio:

— quaisquer alterações ao sistema de ensaio, especialmente se forem utilizadas frações insolúveis ou voláteis,

— tipo de meio orgânico,

— proporção e natureza das eventuais águas residuais provenientes de indústrias, se conhecidas,

— método de inoculação,

▼M4

— solução-mãe do produto químico em estudo — COD (carbono orgânico dissolvido) e COT (carbono orgânico total); forma de preparação, caso se trate de uma suspensão; concentração(ões) de ensaio utilizada(s), justificando eventuais desvios em relação à gama 10-20 mg/l de COD; método de adição; data da primeira adição; quaisquer alterações da concentração,

— tempo médio de retenção hidráulica (sem proliferação); velocidade de rotação do tubo; ângulo de inclinação aproximado, se possível,

— pormenores sobre formação de crostas; tempo e intensidade,

— temperatura, ou gama de temperaturas, de ensaio,

— técnicas de análise utilizadas.

Resultados do ensaio:

— todos os valores medidos (COD, CQO, análises específicas, pH, temperatura, substâncias azotadas, se for caso disso),

— todos os valores calculados dos parâmetros D_t (ou D_{tc}), D_B, D_{St}, na forma de quadro e a partir das curvas de eliminação,

— informações sobre as fases de latência e de patamar, a duração do ensaio, o grau de eliminação do produto químico em estudo, da substância de referência (se utilizada) e do meio orgânico na unidade de controlo, juntamente com dados estatísticos e conclusões sobre a biodegradabilidade e a validade do ensaio,

— discussão dos resultados.

REFERÊNCIAS:

(1) Gerike P., Fischer W., Holtmann W. (1980): Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. *Wat. Res*. 14: 753-758.

(2) Truesdale G.A., Jones K., Vandyke K.G. (1959): Removal of synthetic detergents in sewage treatment proccesses: Trials of a new biologically attackable material.*Wat. Waste Tr. J*. 7: 441-444.

(3) Baumann U., Kuhn G., Benz M. (1998): Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - *Z. Umweltchem. Ökotox.* 10: 214-220.

(4) Gloyna E.F., Comstock R.F., Renn C.E. (1952): Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

(5) Kumke G.W., Renn C.E. (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92-94.

(6) Tomlinson T.G., Snaddon D.H.M. (1966): Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. *Int.J. Air Wat. Pollut*. 10: 865-881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982): Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, Londres.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984): Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, Londres.

(9) Capítulo C.4 deste anexo: "Determinação da Biodegradabilidade 'Fácil', A-F".

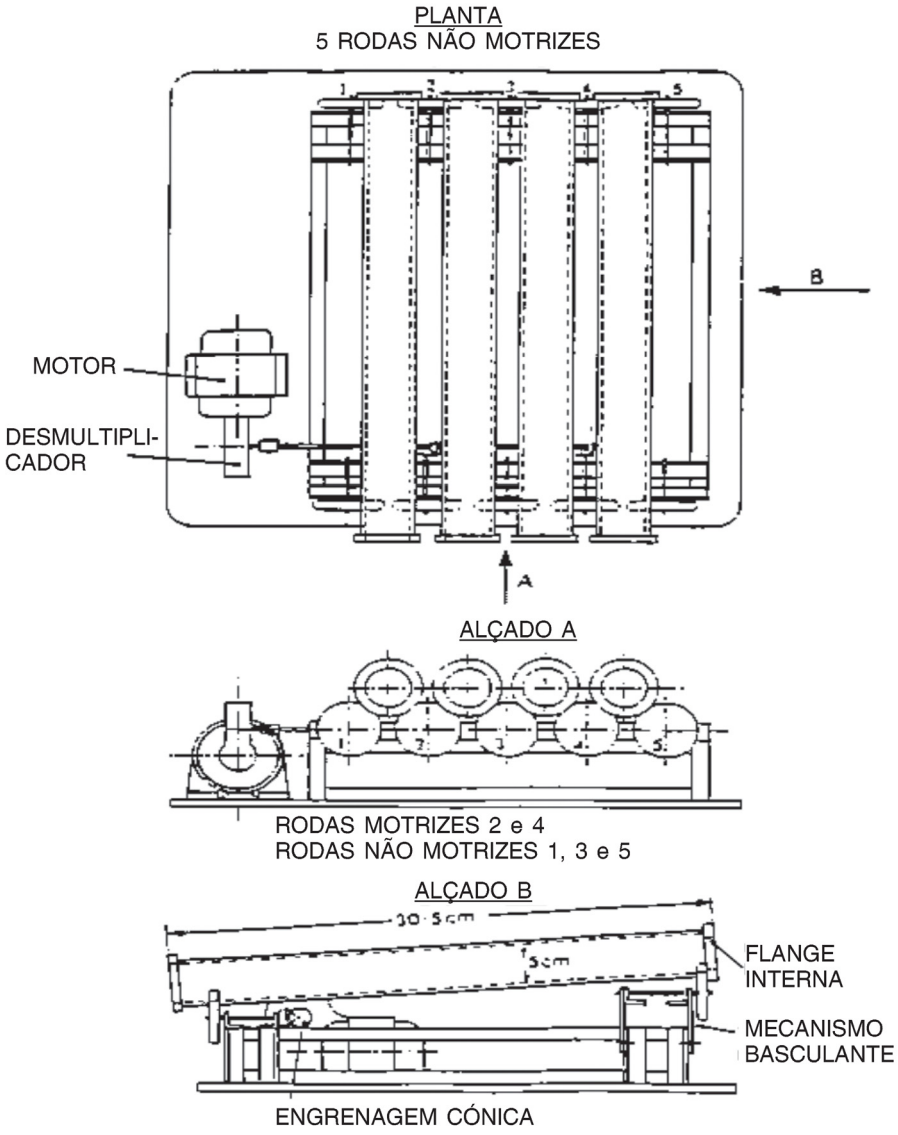
(10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼**M4**

Apêndice 8

Figura 1

Tubos rotativos



Glossário:

planta

alçado A/B

rodas motrizes

rodas não motrizes

motor

desmultiplicador

flange interna

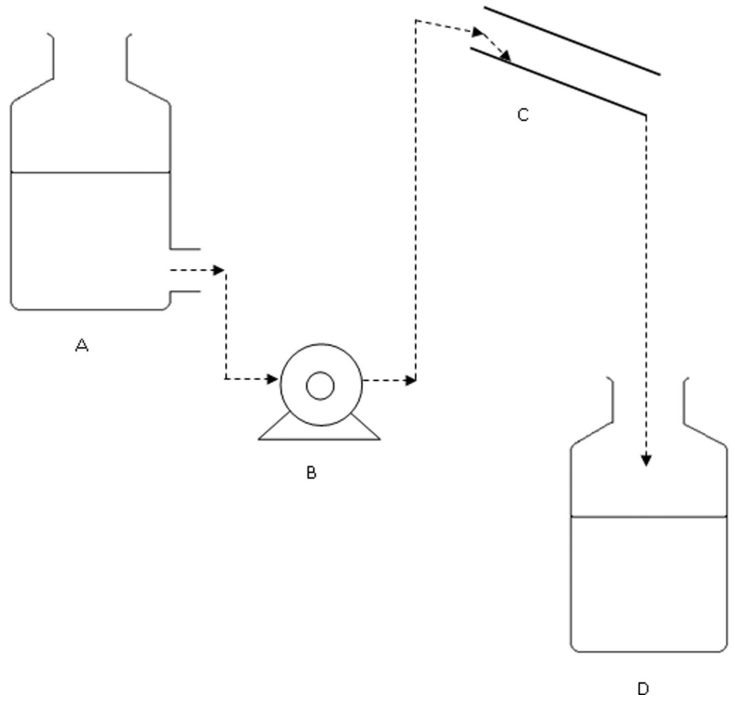
mecanismo basculante

engrenagem cónica

▼**M4**

Figura 2

Diagrama das operações



A: Tanque de alimentação

B: Bomba peristáltica

C: Tubo rotativo

D: Recipiente de recolha do efluente

DEFINIÇÕES

Substância em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Produtos químicos: De notar que o termo "*chemical*", amplamente utilizado nos acordos UNCED e documentos posteriores, abrange substâncias, produtos, misturas, preparações ou quaisquer outros termos utilizados em sistemas existentes para denotar abrangência.

▼B

C.11. **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 microorganismos 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 dispor 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 laxa 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.

▼B

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 oxigénio 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.

▼B

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 residuais 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 tensioactivos 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 ºC, 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 aparelho. Contudo, não deve existir qualquer espaço vazio por cima do líquido e o eléctrodo deve adaptar-se perfeitamente ao gargalo do frasco de medição.

E 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 residuais 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.

▼B

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 1,6g/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 ºC. 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 ºC.

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 «0», a 16 ml de água residual sintética adiciona-se água até perfazer 300 ml. Juntam-se 200 ml de inóculo microbiano e deita-se a mistura (500 ml) para um primeiro recipiente (primeiro controlo C_1).

▼B

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.

▼B

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 microorganismos 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. **REFERÊNCIAS**

(1) Internacional 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.

▼B

C.12. **BIODEGRADAÇÃO**

ENSAIO LASC MODIFICADO

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo do método é avaliar a biodegradação final potencial de substâncias orgânicas solúveis em água e não voláteis quando expostas a concentrações relativamente elevadas de microorganismos durante um longo período de tempo. Durante este período, a viabilidade dos microorganismos é mantida através da adição diária de uma alimentação de águas residuais decantadas. (Para conservação das águas residuais durante o fim-de-semana as mesmas poderão ser guardadas a 4 ºC. Podem-se utilizar alternativamente as águas residuais 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 microorganismos 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 negligenciável,

— 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,

▼B

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 micro-organismos podem ser úteis 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:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_T - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

em que:

D_{ad} = degradação/adição diária.

2. A remoção em percentagem D_{ad} da quantidade de substância presente no início de cada dia:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2(a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(b)]$$

em que:

D_{ad} = degradação/substância no início do dia;

em que os índices i e (i + l)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.

▼B

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 1) 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. PRINCIPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Numa unidade de lamas activadas semicontínua (LASC), colocam-se lamas activadas provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais. Adicionam-se o composto a ensaiar e as águas residuais 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 obtém 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, obtém-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. DETENÇÃO 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 1,51 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 residuais 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.

▼B

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 microorganismos 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 ºC.

Utiliza-se uma concentração elevada de microorganismos 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 cicio de arejamento. Em seguida, verifica-se uma respiração endógena das lamas durante o restante período de arejamento, no decurso do qual o único substrato 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 às 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 are|2mento 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.

▼B

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 ºC 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.

▼B

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 diferença 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 microorganismos 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 uma 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.

▼B

Apêndice 1

Ensaio LASC: EXEMPLOS DE RESULTADOS

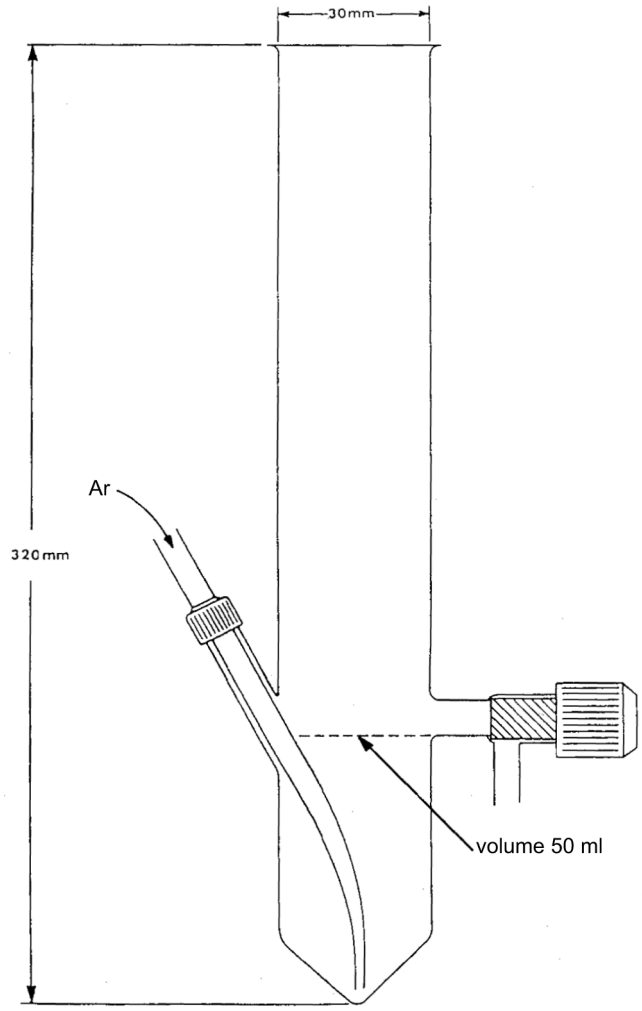
Substâncias	C_E (mg/l)	$c_e - c_c$ (mg/l)	Percentagem de biodegradação	Duração de ensaio (dias)
Sulfonato de 4-acetilaminobenzeno	17,2	2,0	85	40
Sulfonato de tetrapropilenobenzeno	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Dietilenoglicol	16,5	0,2	98,8	40
Anilina	16,9	1,7	95,9	40
Tetracarboxilato de ciclopentano	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Apêndice 2

Exemplo de equipamento

Figure 1



▼B

C.13. BIOCONCENTRAÇÃO: ENSAIO DINÂMICO COM PEIXES

1. MÉTODO

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 305 (1996).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método descreve um processo para a caracterização da bioconcentração potencial de determinadas substâncias em peixes, em condições dinâmicas. Embora seja largamente preferível o recurso a regimes dinâmicos, podem também utilizar-se regimes semiestáticos, na condição de serem satisfeitos os critérios de validade.

O método fornece informações suficientes para a realização do ensaio, permitindo todavia, em larga medida, a adaptação das condições experimentais ao perfil dos laboratórios e às características das substâncias em estudo. O método destina-se particularmente a substâncias orgânicas estáveis com log P_{ow} compreendido entre 1,5 e 6,0 (1), podendo, no entanto, aplicar-se também a substâncias superlipófilas (log P_{ow} > 6,0). A estimativa preliminar do factor de bioconcentração (BCF) das referidas substâncias superlipófilas, por vezes designado K_B, é, em geral, superior ao factor de bioconcentração do estado estacionário (BCF_{SS}) obtido por via experimental. A equação de Bintein *et al.* (2) permite obter uma estimativa preliminar do factor de bioconcentração de substâncias orgânicas com P_{ou} da ordem de 9,0. Os parâmetros que caracterizam o potencial de bioconcentração incluem a constante de velocidade de fixação (k_1), a constante de velocidade de depuração (k_2) e o factor BCF_{SS}.

A utilização de marcadores radioactivos poderá facilitar a análise de amostras de água e de peixes, bem como a determinação da necessidade de identificar e quantificar os produtos de degradação. Caso se determinem os resíduos radioactivos totais (nomeadamente por combustão ou solubilização de tecidos), o factor BCF é calculado com base na substância de origem, nos metabolitos fixados e no carbono assimilado, não sendo, por tal facto, directamente comparável ao factor decorrente de análise química específica da substância de origem.

Nos ensaios com radiomarcadores podem utilizar-se métodos de depuração, determinando o factor BCF com base da substância de origem e procedendo, se necessário, à caracterização dos metabolitos. É também possível combinar um estudo de metabolismo dos peixes com um estudo de bioconcentração, mediante a análise e identificação dos resíduos em tecidos.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

A bioconcentração/bioacumulação consiste no aumento da concentração da substância em estudo num determinado organismo ou em determinados tecidos do mesmo, relativamente à respectiva concentração no meio circundante.

O factor de bioconcentração (BCF ou K_B) em qualquer momento da fase de fixação do ensaio de acumulação consiste no quociente entre a concentração da substância em estudo nos peixes ou em determinados tecidos dos mesmos [C_t expressa em µg/g (ppm)] e a respectiva concentração no meio circundante [C_w, expressa em µg/ml (ppm)].

▼B

O factor de bioconcentração num estado estacionário (BCF_{SS} ou $K_{B)}$ não sofre uma alteração significativa num período longo, uma vez que a concentração da substância em estudo no meio circundante é constante no período em causa.

Um estado estacionário é atingido sempre que a representação gráfica da concentração da substância em estudo nos peixes (C_t) em função do tempo consista numa linha paralela ao eixo dos tempos e três determinações sucessivas de C_t em amostras recolhidas com intervalos de, pelo menos, dois dias, apresentem valores que não difiram em mais de 20 %, na ausência de diferenças significativas entre os três períodos de amostragem. No caso das amostras combinadas, são necessárias, pelo menos, quatro determinações. No caso de substâncias recolhidas de forma lenta, o intervalo mais adequado é de sete dias.

O factor de bioconcentração calculado directamente a partir das constantes cinéticas (k_1/k_2) constitui o factor de concentração cinética, BCF_k.

O coeficiente de partição octanol-água (P_{ow}), também designado K_{ow}, consiste no quociente entre a solubilidade de uma substância em n-octanol e em água, em condições de equilíbrio (método A.8). O logaritmo de P_{ov} é utilizado como indicador de potencial químico de bioconcentração em organismos aquáticos.

A fase de exposição ou de fixação consiste no tempo de exposição dos peixes à substância em estudo.

A constante de velocidade de fixação (k_1) consiste no valor numérico que define a taxa de aumento da concentração da substância em estudo nos peixes ou em determinados tecidos dos mesmos, sempre que se encontrem expostos à substância em causa (a constante k_1 é expressa em $dias^{-1}$).

A fase de pós-exposição ou de depuração consiste no período durante o qual se estuda a depuração da substância pelos peixes ou por tecidos específicos dos mesmos, na sequência da transferência dos animais de um meio que contenha a substância em estudo para um meio que a não contenha.

A constante de velocidade de depuração (k_2) é o valor numérico que define a velocidade de redução da concentração da substância em estudo nos peixes ou em determinados tecidos dos mesmos, na sequência da transferência dos animais de um meio que contenha a substância em estudo por um meio que a não contenha (a constante k_2 é expressa em $dias^{-1}$).

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O ensaio é constituído por duas fases, designadamente a fase de exposição (fixação) e a fase de pós-exposição (depuração). Durante a fase de fixação, diversos grupos de peixes de uma determinada espécie são expostos a, pelo menos, duas concentrações da substância em estudo. Seguidamente, os animais são transferidos para um meio isento da referida substância, onde decorre a fase de depuração. Esta última é sempre necessária, excepto no caso de a quantidade de substância absorvida na fase de fixação ser desprezável (BCF < 10). A concentração da substância em estudo no peixe ou em determinados tecidos do mesmo é acompanhada em ambas as fases do ensaio. Além dos grupos expostos às duas concentrações de ensaio, submete-se um grupo de peixes a condições idênticas, excepto no que respeita à substância em estudo, que é omitida, de modo a estabelecer uma correlação entre os eventuais efeitos negativos observados no ensaio de bioconcentração com um grupo de controlo de referência e a obter as concentrações de fundo da substância em estudo.

▼B

A fase de fixação deverá durar 28 dias, excepto se o equilíbrio for atingido antes. A equação que se apresenta no apêndice 3 permite prever a duração da fase de fixação, bem como o surgimento da fase estacionária. O período de depuração inicia-se com a transferência dos peixes para um meio idêntico que não contenha a substância em estudo, num recipiente limpo. Sempre que possível, deve calcular-se o factor de bioconcentração na forma de quociente (BCF_{SS}) das concentrações nos peixes (C_t) e na água (C_u, num estado estacionário aparente, e também o factor de bioconcentração cinético (BCF_k, que consiste no quociente entre as constantes de velocidade de fixação (k_1) e de depuração (k_2), assumindo um processo cinético de primeira ordem. Caso o processo não apresenta uma cinética de primeira ordem, devem aplicar-se modelos mais complexos (ver apêndice 5).

Caso não se atinja o estado estacionário em 28 dias, a fase de fixação deve ser prolongada, até um máximo de 60 dias, iniciando-se então a fase de depuração.

A constante de velocidade de fixação, a constante de velocidade de depuração, as constantes decorrentes da aplicação de modelos mais complexos, o factor de bioconcentração e, sempre que possível, os intervalos de confiança de cada parâmetro, devem ser calculados com base no modelo mais adequado à descrição das concentrações da substância em estudo nos peixes e na água.

O factor BCF é expresso em função da massa húmida total dos peixes. Todavia, podem utilizar-se, para fins específicos, determinados tecidos ou órgãos (por exemplo, tecido muscular ou fígado), caso as dimensões dos animais o permitam, podem também dividir-se os peixes em porções comestíveis e não comestíveis (vísceras). Uma vez que, no que respeita a muitas substâncias orgânicas, existe uma nítida relação entre o potencial de bioconcentração e a lipofilia, existe também uma relação entre o teor de lípidos dos peixes em estudo e a bioconcentração das substâncias em causa. De modo a reduzir a variabilidade dos resultados, no que respeita ás substâncias com elevada lipofilia (log P_{ow} > 3), a bioconcentração deve ser expressa em função de teor de lípidos, bem como da massa corpórea total.

Sempre que tal seja viável, deve determinar-se o teor de lípidos do material biológico utilizado para determinar a concentração da substância em estudo.

1.4. INFORMAÇÕES RELATIVAS À SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

Antes de realizar o ensaio de bioconcentração, devem possuir-se as seguintes informações relativas a substância em estudo:

a) Solubilidade em água;

b) Coeficiente de partição octanol-água, P_{ow} (também designado K_{ow}), determinado por HPLC de acordo com o método A.8;

c) Hidrólise;

d) Fotossensibilidade em água, determinada por irradiação solar natural ou simulada, bem como nas condições de irradiação do ensaio de bioconcentração (3);

▼B

e) Tensão superficial (no caso de substâncias cujo log P_{ow} não possa ser determinado);

f) Pressão de vapor;

g) Biodegradabilidade natural (se adequado).

A toxicidade para a espécie utilizada no ensaio constitui outra das informações necessárias, devendo conferir-se especial atenção à toxicidade assintótica (isto é, independente do tempo) LC_{50}. Para a quantificação da substância em estudo nas soluções, bem como no material biológico, deve utilizar-se um método analítico adequado, de exactidão, precisão e sensibilidade conhecidas, devendo possuir-se informações pormenorizadas sobre a preparação e armazenagem da amostra. Deve também conhecer-se o limite de detecção da substância em estudo na água e nos tecidos dos peixes. Caso se utilize uma substância marcada com ^{14}C, é necessário conhecer a percentagem de radioactividade associada às impurezas.

1.5. VALIDADE DO ENSAIO

Para que o ensaio seja válido, devem satisfazer-se as seguintes condições:

— as variações de temperatura devem ser inferiores a ± 2 ºC,

— a concentração de oxigénio dissolvido não deve ser inferior a 60 % da concentração de saturação,

— a variação da concentração da substância em estudo nas células não deve exceder ± 20 % da média dos valores determinados na fase de fixação,

— a mortalidade ou quaisquer outros efeitos nocivos registados no final do ensaio, tanto no que respeita ao lote de controlo como ao lote de ensaio, deve ser inferior a 10 %; caso o ensaio se prolongue por várias semanas ou meses, os referidos factores não devem exceder 5 % por mês e 30 % na totalidade.

1.6. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

A utilização de substâncias de referência de potencial de bioconcentração conhecido apresenta utilidade na comprovação do procedimento experimental, sempre que necessário. Todavia, não se afigura ainda possível recomendar substâncias específicas.

1.7. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.7.1. *Equipamento*

No que respeita ao equipamento, deve evitar-se a utilização de materiais que apresentem riscos de dissolução, absorção ou lixiviação, ou possam apresentar efeitos nocivos nos animais. Podem utilizar-se tanques em forma de paralelepípedo ou cilindro, de um material quimicamente inerte, com capacidade adequada à população. Deve evitar-se tanto quanto possível o uso de tubos de plástico flexível, recorrendo-se, de preferência, a tubos de teflon (R), aço inoxidável e/ou vidro. A experiência tem demonstrado que, no caso de substâncias com coeficientes de adsorção elevados, nomeadamente os piretróides sintéticos, pode ser necessário utilizar vidro silanizado. Em tais casos, o equipamento deve ser descartado após o uso.

▼B

1.7.2. *Água*

Em princípio, o ensaio deve utilizar água natural proveniente de uma fonte não contaminada e de qualidade uniforme. A qualidade da água de diluição deve permitir a sobrevivência da espécie durante as fases de aclimatação e de ensaio sem que os animais adquiram uma aparência ou um comportamento anormais. Em condições ideais, a espécie em causa deve poder sobreviver, desenvolver-se e reproduzir-se na água de diluição (nomeadamente em cultura laboratorial ou num ensaio de toxicidade em toda a vida). Devem conhecer-se, pelo menos, os seguintes parâmetros: pH, dureza, sólidos totais, carbono orgânico total, bem como, se possível, amónio, nitritos, alcalinidade e, no caso de ensaios com espécies marinhas, salinidade. Os parâmetros que possuem importância para o bem-estar dos animais são bem conhecidos; contudo, o apêndice 1 apresenta as concentrações máximas recomendadas de diversos factores em águas doces e salgadas.

A qualidade da água deve manter-se constante no decurso do ensaio. O pH deve oscilar entre 6,0 e 8,5, embora, no decurso de um determinado ensaio, a respectiva variação não deva exceder ± 0,5. De modo a assegurar que a água de diluição não afecta os resultados (nomeadamente devido à complexação da substância em estudo) ou o comportamento dos animais, devem recolher-se periodicamente amostras da mesma para análise, procedendo-se à determinação dos metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), principais aniões e catiões (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na -, K -, Cl-, SO_4^{2-}), pesticidas (nomeadamente pesticidas organofosforados totais e organoclorados totais), carbono orgânico total e sólidos em suspensão, com uma frequência aproximadamente trimestral, caso a qualidade da água de diluição seja relativamente constante. Se a referida qualidade se revelar constante num período não inferior a um ano, as determinações podem ser menos frequentes, efectuando-se com intervalos alargados (por exemplo, semestrais).

O teor de partículas naturais, bem como de carbono orgânico total, da água de diluição deve ser tão reduzido quanto possível, de modo a evitar a adsorção de substância em estudo pela matéria orgânica, reduzindo a sua biodisponibilidade (4). O valor máximo aceitável é de 5 mg/l, no caso das partículas (matérias secas que não passem através de um filtro de 0,45 μm) e 2 mg/l no caso do carbono orgânico total (ver apêndice 1). Se necessário, a água deverá ser filtrada antes do uso. A contribuição das excreções dos peixes e dos resíduos alimentares para o teor de carbono orgânico total deve ser tão reduzida tanto quanto possível. No decurso do ensaio, a concentração de carbono orgânico no recipiente não deve exceder a concentração de carbono orgânico proveniente da substância em estudo e do agente de solubilização (se utilizado) em mais de 10 mg/l (± 20 %).

1.7.3. *Soluções de ensaio*

Prepara-se uma solução-mãe da substância em estudo, de concentração adequada, de preferência misturando ou agitando a substância com a água de diluição. Não é aconselhável utilizar solventes ou dispersantes (agentes de solubilização) embora, em determinados casos, possa recorrer-se aos mesmos para obter uma concentração adequada. Os solventes que podem ser utilizados são o etanol, o metanol os éteres mono e dimetílico do etilenoglicol a dimetilformamida e o trietilenoglicol. No que respeita aos dispersantes, podem utilizar-se o Cremophor RH40, o Tween 80, a metilcelulose a 0,01 % e o HCO-40. Os agentes que apresentem biodegradabilidade natural devem utilizar-se com precaução, uma vez que podem originar problemas de crescimento bacteriano nos ensaios dinâmicos. A substância em estudo pode ser marcada com um radioisótopo, devendo ser de um grau de pureza elevado (de preferência superior a 98 %).

▼B

Em ensaios dinâmicos, é necessário utilizar um sistema de fornecimento e diluição contínuos da solução-mãe da substância em estudo (por exemplo, bomba com regulação de caudal, diluidor proporcional, sistema de saturação), de modo a alimentar os recipientes de ensaio. De preferência, devem efectuar-se diariamente pelo menos cinco renovações do volume de cada recipiente de ensaio. Em princípio, devem utilizar-se condições dinâmicas; todavia, se tal não se afigurar possível (por exemplo, caso os animais sejam afectados) pode recorrer-se a uma técnica semiestática, na condição de serem satisfeitos os critérios de validade. Os caudais da solução-mãe e da água de diluição devem ser verificados 48 horas antes do início do ensaio e com uma frequência pelo menos diária no decurso do mesmo, A referida verificação inclui a determinação do caudal em cada recipiente de ensaio, devendo assegurar-se que o mesmo não regista uma variação superior a 20 % num determinado recipiente ou entre dois recipientes.

1.7.4. *Selecção das espécies*

Os principais critérios de selecção das espécies consistem na sua fácil disponibilidade, nas dimensões adequadas e na facilidade de manutenção no laboratório. Outros critérios incluem o interesse recreativo e comercial e a importância ecológica, bem como a sensibilidade relativa, os antecedentes de utilização, etc.

O apêndice 2 refere as espécies recomendadas. Podem utilizar-se outras espécies, devendo, contudo, adaptar-se os procedimentos de modo a obter condições de ensaio adequadas. Em tais casos, deve apresentar-se o fundamento da selecção da espécie e do método experimental.

1.7.5. *Tratamento dos peixes*

Deve aclimatar-se a população de ensaio durante, pelo menos, duas semanas, à temperatura de ensaio, alimentando-a com uma dieta idêntica à utilizada no decurso do ensaio.

Após um período de adaptação de 48 horas, regista-se a mortalidade, aplicando os seguintes critérios:

— caso a mortalidade exceda 10 % da população em sete dias, desprezar a totalidade do lote,

— caso a mortalidade se situe entre 5 e 10 % da população em sete dias, aclimatar os peixes por um período de sete dias suplementares,

— caso a mortalidade seja inferior a 5 % da população em sete dias, aproveitar o lote; se a mortalidade registada no segundo período de sete dias for superior a 5 %, desprezar a totalidade do lote.

Os animais a utilizar nos ensaios não devem apresentar doenças ou perturbações observáveis. Devem rejeitar-se quaisquer animais doentes. Além disso, os peixes não devem ser objecto de tratamento contra eventuais afecções nas duas semanas que procedem o ensaio e durante o mesmo.

▼B

1.8. REALIZAÇÃO DO ENSAIO

1.8.1. *Ensaio preliminar*

Poderá ser útil efectuar um ensaio preliminar com o objectivo de optimizar as condições do ensaio definitivo no que respeita, nomeadamente, à selecção da concentração da substância em estudo e á duração das fases de fixação e de depuração.

1.8.2. *Condições de exposição*

1.8.2.1. Duração da fase de fixação

Pode obter-se uma estimativa da duração da fase de fixação com base na experiência prática (por exemplo, dados decorrentes de um estudo prévio ou dados relativos à acumulação de uma substância afim), bem como em determinadas relações empíricas que utilizam conhecimentos decorrentes da solubilidade da substância em água ou do respectivo coeficiente de partição octanol/água (ver apêndice 3).

A fase de fixação deve durar, pelo menos, 28 dias, excepto se o equilíbrio for atingido antes. Se o estado estacionário não for atingido em 28 dias, deve prolongar-se a fase de fixação, procedendo a determinações complementares, até um máximo de 60 dias.

1.8.2.2. Duração da fase de depuração

Em geral, um período com uma duração de ordem de metade da fase de fixação é suficiente para uma redução adequada (isto é, cerca de 95 %) da carga corporal da substância em estudo (ver o apêndice 3 para uma especificação da estimativa). Se o período necessário para a referida redução de 95 % exibir urna extensão que o torne impraticável (mais de 56 dias), pode utilizar-se um período mais curto (ou seja, até que a concentração da substância em estudo seja inferior a 10 % da concentração do estado estacionário). Todavia, no caso de substâncias com perfis de fixação e de depuração mais complexos que no caso de modelos com uma cinética de primeira ordem, devem adaptar-se períodos de depuração alargados, e modo a determinar a velocidade do processo. O período em causa pode ser definido pelo período em que a concentração da substância em estudo nos peixes permanece superior ao limite de detecção.

1.8.2.3. Número de animais

O número de peixes a utilizar por concentração de ensaio deve ser seleccionado de forma a que se disponha de quatro animais por amostragem. Se for exigido um rigor estatístico superior, deve dispor-se de mais peixes por amostragem.

Caso se utilizem peixes adultos, deve especificar-se o respectivo sexo. Caso se utilizem animais de ambos os sexos, as diferenças entre os respectivos teores de lípidos antes do início da exposição não devem ser significativas, podendo ser necessário reunir os machos e as fêmeas.

▼B

Em qualquer ensaio, seleccionam-se peixes de massa semelhante, de modo que a massa do mais leve não seja inferior a 2/3 da massa do mais pesado. Os peixes devem ser de mesma coorte (classe etária) e da mesma proveniência. Uma vez que a massa e a idade dos peixes parecem, por vezes, apresentar um efeito significativo nos valores do factor BCF (1), devem registar-se de forma precisa os pormenores em causa. Recomenda-se a pesagem de uma amostra do lote de peixes, de modo a calcular a massa média.

1.8.2.4. Introdução dos animais

Devem utilizar-se rácios elevados água/peixes, de modo a minimizar a redução de C_w determinada pela introdução dos peixes no início do ensaio, bem como do decréscimo da concentração do oxigénio dissolvido. A taxa de carga deve ser adequada às espécies utilizadas. Recomenda-se, em geral, uma taxa diária de 0,1 a 1,0 g de peixes (massa húmida) por litro de água. Caso a concentração requerida da substância em estudo não registe uma variação superior a ± 20 % e a quantidade de oxigénio dissolvido não atinja valores inferiores a 60 % da concentração de saturação, podem utilizar-se taxas de carga mais elevadas.

Na selecção dos regimes de carga adequados deve ter-se em conta o habitat normal das espécies em causa. Por exemplo, as espécies bentónicas necessitam de aquários com maior área de base que as espécies pelágicas, para o mesmo volume de água.

1.8.2.5. Alimentação

Durante os períodos de aclimatação e de ensaio, os peixes são alimentados com uma dieta adequada, de teor total de lípidos e de proteínas conhecido, numa quantidade suficiente para mantê-los em condições saudáveis e manter constante a respectiva massa corporal. Os animais são alimentados diariamente, sendo a quantidade de alimentos fornecida de ordem de 1 a 2 % da massa corporal/dia, o que permite manter a concentração de lípidos da maioria das espécies a níveis relativamente constantes, durante o ensaio. A quantidade de alimentos deve ser reavaliada com uma frequência, por exemplo, semanal, de modo a manter constantes a massa corporal e o teor de lípidos. Para tal, pode estimar-se a massa dos peixes de cada célula de ensaio com base na massa do peixe retirado mais recentemente da mesma. Não devem pesar-se os peixes que permanecem nas células.

Os alimentos remanescentes e as fezes são removidos diariamente das células de ensaio, 30 minutos a 1 hora após o fornecimento dos alimentos. As células devem manter-se tão limpas quanto possível ao longo do ensaio, de modo a que a concentração de matérias orgânicas seja mantida aos níveis mais reduzidos, uma vez que a presença de carbono orgânico pode limitar a biodisponibilidade da substância em estudo (1).

Uma vez que muitos alimentos contêm ingredientes à base de peixe, deve averiguar-se a ocorrência da substância em estudo nos mesmos. Deve também pesquisar-se a ocorrência de pesticidas e metais pesados nos alimentos.

▼B

1.8.2.6. Iluminação e temperatura

O período de irradiação é, em geral, de 12 a 16 horas, devendo a temperatura, cuja variação não deve exceder ± 2 ºC, ser adequada às espécies em estudo (ver apêndice 2). Deve especificar-se o tipo e as características da iluminação e atender-se à eventual fotólise da substância em estudo nas condições de irradiação do ensaio. Devem utilizar-se fontes de iluminação adequadas, de modo a evitar a exposição dos animais a produtos de fotólise não naturais. Em alguns casos, pode afigurar-se adequado utilizar um filtro que elimine as radiações ultravioletas de comprimento de onda inferior a 290 nm.

1.8.2.7. Concentrações de ensaio

Os peixes são expostos, em condições dinâmicas, a, pelo menos, duas concentrações da substância em estudo em água. Em geral, a concentração mais elevada deve ser da ordem de 1 % da concentração LC_{50} aguda assintótica e, pelo menos, dez vezes superior ao limite de detecção em água do método analítico utilizado.

A concentração mais elevada pode também ser calculada através do quociente de LC_{50} em 96 horas por um rácio concentração aguda/-crónica (os rácios adequados a determinadas substâncias podem variar de 3 a 100). Sempre que possível, as restantes concentrações devem diferir da concentração mais elevada num factor de 10. Caso a aplicação dos critérios baseados no parâmetro LC_{50} e no limite de detecção não se afigure viável, pode utilizar-se um factor inferior a 10 ou, em alternativa, recorrer a uma substância marcada com ^{14}C. Não devem utilizar-se concentrações superiores à solubilidade da substância em estudo.

Caso se utilize um agente de solubilização, a respectiva concentração não deve exceder 0,1 ml/l, devendo ser idêntica em todos os recipientes. Deve conhecer-se a contribuição do referido agente, juntamente com a substância em estudo, por o teor de carbono orgânico total da água. Deve, contudo, evitar-se ao máximo a utilização de tais substâncias.

1.8.2.8. Controlos

Além das séries de ensaio, deve efectuar-se um controlo com água de diluição ou, se adequado, com o agente de solubilização, na condição de este último não apresentar efeitos negativos nos peixes. Caso contrário, devem efectuar-se ambos os controlos.

1.8.3. *Frequência das determinações da qualidade da água*

Durante o ensaio, devem determinar-se em todos os recipientes o oxigénio dissolvido, o carbono orgânico total, o pH e a temperatura. Além disso, devem determinar-se a dureza e, se for caso disso, a salinidade, das amostras de controlo e da água de um dos recipientes em que a concentração da substância em estudo seja mais elevada. O oxigénio dissolvido e, se for caso disso, a salinidade, devem ser determinados, no mínimo, três vezes durante o período de fixação (no início, na fase intermédia e no final) e com uma frequência semanal no decurso da fase de depuração. O carbono orgânico total deve ser determinado no início do ensaio (48 h e 24 h antes do início), antes da colocação dos peixes nos recipientes e, pelo menos, uma vez por semana no decurso das fases de fixação e depuração. Deve determinar-se a temperatura diariamente, o pH no início e no final da cada período e a dureza uma vez em cada ensaio. Deve determinar-se a temperatura em contínuo pelo menos num dos recipientes.

▼B

1.8.4. *Amostragem e análise dos peixes e da água*

1.8.4.1. Calendário da recolha de amostras de peixes e de água

Devem recolher-se amostras de água para a determinação da concentração da substância em estudo antes da colocação dos peixes nos recipientes, bem como no decurso das fases de fixação e depuração. As amostras de água devem, no mínimo, ser recolhidas em simultâneo com os peixes e antes da alimentação. Durante a fase de fixação, as concentrações da substância em estudo são determinadas de modo a verificar o respeito dos critérios de validade.

Os peixes são recolhidos em, pelo menos, cinco ocasiões no decurso da fase de fixação e em, pelo menos, quatro ocasiões, durante a fase de depuração. Uma vez que, por vezes, se torna difícil efectuar uma estimativa razoavelmente precisa do factor BCF com base no número de amostras, em especial no caso de a depuração envolver processos que não apresentem uma cinética de primeira ordem, é aconselhável recolher amostras com uma frequência superior, em ambos os períodos (ver apêndice 4). As amostras suplementares são armazenadas, sendo apenas analisadas se os resultados da primeira série de determinações forem insuficientes para o cálculo do referido factor com a precisão desejada.

O apêndice 4 apresenta um exemplo de calendário de amostragem. Podem elaborar-se outros calendários mediante a utilização de outros valores do P_{ow} para o cálculo do tempo de exposição necessário a uma fixação de 95 %.

A amostragem deve prosseguir durante a fase de fixação até ser atingido o estado estacionário, num máximo de 28 dias. Caso o estado estacionário não seja atingido em 28 dias, a amostragem deverá prosseguir até um máximo de 60 dias. Antes do início da fase de depuração, os peixes são transferidos para células limpas.

1.8.4.2. Recolha e preparação das amostras

As amostras de água para análise são recolhidas, por exemplo, por bombagem através de tubos inertes, a partir de um ponto central na célula de ensaio. Uma vez que nem sempre se afigura possível separar as fracções não biodisponível e biodisponível da substância em estudo por filtração ou centrifugação (em especial no caso de substâncias superlipófilas, isto é, substâncias com log P_{ow} > 5) (1) (5).

As amostras não devem ser sujeitas a tais processos, devendo adoptar-se medidas para manter as células tão limpas quanto possível e determinar-se o teor de carbono orgânico em ambas as fases (fixação e depuração).

Em cada amostragem, recolhe-se um número adequado de peixes (de modo geral, igual ou superior a 4) das células de ensaio. Os animais em causa são lavados rapidamente com água, secos, mortos instantaneamente, por recurso a métodos humanos, e pesados.

É aconselhável analisar os peixes e a água imediatamente após a recolha das amostras, de modo a evitar eventuais efeitos, nomeadamente devidos à degradação, calculando as taxas de fixação e depuração aproximadas em função do avanço do ensaio. A análise imediata permite também identificar prontamente o início de uma fase estacionária.

▼B

Caso não se proceda à análise imediata, as amostras são armazenadas de acordo com um método adequado. Antes do início do ensaio, devem obter-se dados relativos à armazenagem adequada da substância em estudo, nomeadamente por ultracongelação, manutenção a 4 ºC, extracção, etc., bem como à duração da mesma.

1.8.4.3. Qualidade do método analítico

Uma vez que o processo global é determinado essencialmente pela exactidão, precisão e sensibilidade do método analítico utilizado, deve comprovar-se experimentalmente a adequação ao mesmo da precisão e reprodutibilidade deste último, bem como do método de recolha da substância em estudo a partir da água e dos peixes, ao referido método. Deve também comprovar-se a não detectabilidade da substância em estudo na água de diluição.

Se necessário, os valores de C_w e C_f obtidos no ensaio são corrigidos de modo a ter em conta as recuperações e as concentrações de fundo dos controlos. As amostras de peixes e de água devem ser manipuladas de modo a minimizar contaminações e perdas, resultantes, nomeadamente, da adsorção pelos equipamentos de amostragem.

1.8.4.4. Análise das amostras de peixes

Caso se utilizem radiomarcadores, pode determinar-se a radioactividade total (isto é, da substância de origem e dos seus metabolitos) ou, como alternativa, tratar as amostras de modo a que a substância de origem seja analisada separadamente. Além disso, os principais metabolitos podem ser caracterizados no estado estacionário ou no final da fase de fixação, consoante o que ocorrer primeiro. Se o factor BCF calculado com base nos resíduos radioactivos totais for igual ou superior a 1 000 %, pode ser aconselhável e mesmo, no caso de determinadas categorias de substâncias, tais como os pesticidas, fortemente recomendável, identificar e quantificar os produtos de degradação que representem 10 % ou mais da totalidade dos resíduos nos tecidos dos peixes, no estado estacionário. Caso se identifiquem e quantifiquem os produtos de degradação que representam 10 % ou mais dos resíduos totais marcados com radioisótopos nos tecidos dos peixes, recomenda-se também a identificação e quantificação dos produtos de degradação na água do ensaio.

Em geral, deve determinar-se a concentração da substância em estudo para cada peixe pesado. Se tal não for possível, podem combinar-se as amostras em cada amostragem, sem prejuízo do tratamento estatístico dos dados. Caso a especificidade e o rigor do método estatístico sejam importantes, deve utilizar-se no ensaio um número adequado de peixes, de modo a adaptar o procedimento de combinação ao rigor do método (6) (7).

O factor BCF deve ser expresso em função da massa húmida total e, no caso de substâncias altamente lipófilas, em função também do teor de lípidos. O teor de lípidos dos peixes deve ser determinado, se possível, em cada amostragem, devendo, para tal, utilizar-se métodos adequados (ver os pontos 8 e 2 do apêndice 3). Como método-padrão, pode recomendar-se a extracção com clorofórmio/metanol (9). A aplicação de métodos diversos não conduz a resultados idênticos (10), pelo que devem fornecer-se pormenores sobre o método utilizado. Sempre que possível, deve efectuar-se a determinação dos lípidos no extracto utilizado para a análise da substância em estudo, uma vez que, com frequência, é necessário remover os mesmos do extracto antes da análise cromatográfica deste último. O teor de lípidos dos peixes no final da experiência, expresso em mg/kg, não deve diferir do teor inicial em mais de 25 %. Deve também referir-se a percentagem de matéria seca nos tecidos, de modo a permitir converter o teor de lípidos em relação à massa húmida no teor relativo à massa seca.

▼B

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

A curva de fixação da substância em estudo é obtida através da representação gráfica da respectiva concentração nos peixes ou em determinados tecidos dos mesmos na fase de fixação, em função do tempo, numa escala aritmética. Quando se observar o início do estado estacionário, isto é, quando a curva se tornar aproximadamente assintótica relativamente ao eixo dos tempos, calcula-se o factor BCF_{ss} do seguinte modo:

$$\frac{C_f \text{ no estado estacionário (média)}}{C_w \text{ no estado estacionário (média)}}$$

Se não for atingido o estado estacionário, pode calcular-se um factor BCF_{ss} suficientemente preciso para a avaliação dos riscos assumindo um estado estacionário «virtual», a 80 % ($1{,}6/k_2$) ou 95 % ($3{,}0/k_2$) do equilíbrio.

O factor de concentração (BCF_k) consiste no quociente das constantes cinéticas de primeira ordem, k_1/k_2. De modo geral, a constante de velocidade de depuração (k_2) é determinada com base na curva de depuração (representação gráfica do decréscimo da concentração da substância em estudo nos peixes em função do tempo), calculando-se a constante de velocidade de fixação (k_1) com base em k_2 e num valor de C_t obtido da curva de fixação (ver também o apêndice 5). O método mais aconselhável para obter o factor BCF_k e as constantes k_1 e k_2 consiste no recurso a métodos computacionais de estimativa não linear de parâmetros (11). Caso contrário, podem utilizar-se métodos gráficos para o cálculo das constantes cinéticas. Se a curva de depuração revelar de modo inequívoco que o processo não segue uma cinética de primeira ordem, há que recorrer a modelos mais complexos (ver referências no apêndice 3), procurando a orientação de um perito em bioestatística.

2.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Sempre que as concentrações das soluções de ensaio sejam próximas do limite de detecção do método analítico utilizado, os resultados devem ser interpretados com precaução.

A obtenção de curvas de fixação e de depuração bem definidas constitui um indicador da qualidade dos dados relativos à bioconcentração. A variação das velocidades de fixação e depuração obtidas com ambas as concentrações de ensaio deve ser inferior a 20 %, devendo registar-se e tentar explicar-se a ocorrência de variações significativas das referidas velocidades. O intervalo de confiança dos valores de BCF obtidos em estudos adequados é, em geral, da ordem de ± 20 %.

3. **RELATÓRIO**

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

3.1. SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

— natureza física e, se adequado, propriedades físico-químicas,

— dados decorrentes de análise química (incluindo o teor de carbono orgânico, se adequado),

— no caso da utilização de radiomarcadores, posição do(s) átomo(s) substituído(s) e percentagem de radioactividade associada às impurezas.

▼B

3.2. ESPÉCIES ANIMAIS UTILIZADAS

— denominação científica, variedade, origem, pré-tratamento eventual, aclimatação, idade, gama de dimensões, etc.

3.3. CONDIÇÕES DE ENSAIO

— tipo de procedimento utilizado (ensaio dinâmico ou semiestático),

— tipo e características da iluminação utilizada e respectivo período,

— concepção do ensaio (número e dimensões das células de ensaio, taxa de renovação do volume de água, número de replicados, números de peixes por replicado, número de concentrações de ensaio, duração das fases de fixação e depuração, frequência de amostragem de peixes e de água),

— método de preparação das soluções-mãe e frequência de renovação (caso se utilize um agente de solubilização, deve fornecer-se a respectiva concentração, bem como a contribuição do mesmo para o teor de carbono orgânico da água),

— concentrações de ensaio nominais, média e desvio-padrão dos valores determinados e método de obtenção dos mesmos,

— fonte de água de diluição, descrição do eventual pré-tratamento desta última, resultados de quaisquer ensaios destinados a comprovar a adequação da água aos peixes e características da água: pH, dureza, temperatura, concentração de oxigénio dissolvido, cloro residual (se determinado), carbono orgânico total, sólidos em suspensão, salinidade (se adequado) e quaisquer outras determinações efectuadas,

— qualidade da água nos recipientes de ensaio (pH, dureza, carbono orgânico total, temperatura e concentração de oxigénio dissolvido),

— informações pormenorizadas sobre a alimentação dos animais (por exemplo, tipo de alimentos, origem e composição dos mesmos — se possível, apresentar, pelo menos, o respectivo teor de lípidos e proteínas —, quantidade fornecida e frequência),

— informações sobre o tratamento das amostras de peixes e de água, incluindo pormenores relativos à preparação, armazenagem e extracção, bem como métodos analíticos aplicados à substância em estudo e à eventual determinação do teor de lípidos, incluindo a respectiva precisão.

3.4. RESULTADOS

— resultados de quaisquer estudos preliminares efectuados,

— mortalidade dos peixes do lote de controlo e dos peixes expostos à substância, bem como qualquer comportamento anormal observável,

— teor de lípidos dos peixes (se determinado no decurso do ensaio),

— curvas de fixação e de depuração da substância em estudo pelos peixes, exibindo os valores determinados e incluindo o intervalo de surgimento do estado estacionário,

▼B

— concentrações C_f e C_w (incluindo os respectivos desvios-padrão e gama, se adequado) para todos os períodos de amostragem. Deve exprimir-se a concentração C_f em µg/g (ppm) de massa húmida do animal na sua totalidade ou de determinados tecidos do mesmo, nomeadamente tecidos ricos em lípidos; o valor C_w é expresso em µg/ml (ppm). Devem também apresentar-se os valores de C_w relativos às séries de controlo, bem como as concentrações de fundo,

— factor de bioconcentração no estado estacionário (BCF_{SS}), e/ou factor de concentração cinético (BCF_k), bem como, se for caso disso, os intervalos de confiança (95 %) das constantes de velocidade de fixação e depuração (expressos em relação à massa húmida dos peixes e ao teor total de lípidos, se determinado, dos animais ou de determinados tecidos dos mesmos), intervalos de confiança e desvio-padrão (se disponíveis). Devem também referir-se os métodos computacionais e/ou de análise de dados aplicados a cada concentração da substância em estudo,

— caso se utilizem radiomarcadores, pode, se necessário, apresentar-se a acumulação de quaisquer metabolitos detectados,

— devem referir-se quaisquer ocorrências especiais registadas no decurso do ensaio, bem como quaisquer desvios relativamente ao procedimento ou outras informações de relevo.

O número de resultados classificados de «não detectados no limite de detecção» deve ser minimizado mediante o desenvolvimento de um método e de um protocolo experimental preliminares; os referidos resultados não podem ser utilizados para o cálculo das constantes de velocidade.

4. REFERÊNCIAS

(1) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, p. 117-156.

(2) Bintein S., Devillers, J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, p. 29-390.

(3) OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of Chemicals in Water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No 3.

(4) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavaila- bility of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(5) US EPA 822-R-94-002 (1994). Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.

(6) US FDA, (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.

(7) US EPA (1974). Section 5, A(l). Analysis of Human Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Evironmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

(8) Compaan H. (1980). in «The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation». Ch. 2.3, Part II. Government Publisshing Office, the Hague, The Netherlands.

▼B

(9) Gardner *et al.,* (1995). Limn. & Oceanogr. 30, p. 1099-1105.

(10) Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol. Chem. 10, p. 1431-1436.

(11) CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984-1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

(12) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988). Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

▼B

Apêndice 1

Características químicas de uma água de diluição adequada

	Substância	Concentração limite
1	Teor de partículas	5 mg/l
2	Carbono orgânico total	2 mg/l
3	Amoníaco não ionizado	1 µg/l
4	Cloro residual	10 µg/l
5	Pesticidas organofosforados totais	50 ng/l
6	Pesticidas organoclorados totais e bifenilos policlorados	50 ng/l
7	Cloro orgânico total	25 ng/l
8	Alumínio	1 µg/l
9	Arsénio	1 µg/l
10	Crómio	1 µg/l
11	Cobalto	1 µg/l
12	Cobre	1 µg/l
13	Ferro	1 µg/l
14	Chumbo	1 µg/l
15	Níquel	1 µg/l
16	Zinco	1 µg/l
17	Cádmio	100 ng/l
18	Mercúrio	100 ng/l
19	Prata	100 ng/l

▼B

Apêndsice 2

Espécies recomendadas para o ensaio

	Espécies recomendadas	Gama de temperaturas de ensaio recomendadas (°C)	Comprimento recomendado dos animais de ensaio (cm)
1	*Danio rerio* (1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton--Buchanan)	20-25	3,0 ± 0,5
2	*Pimephales promelas* (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque)	20-25	5,0 ± 2,0
3	*Cyprinus carpio* (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus)	20-25	5,0 ± 3,0
4	*Oryzias latipes* (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel)	20-25	4,0 ± 1,0
5	*Poecilia reticulata* (Teleostei, Poeciliidae) (Peters)	20-25	3,0 ± 1,0
6	*Lepomis macroehirus* (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Bluegill	20-25	5,0 ± 2,0
7	*Oncorbynchus mykiss* (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum)	13-17	8,0 ± 4,0
8	*Gasterosteus aculeatus* (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus)	18-20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer A., Orti G. (1993). Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231.

Diversas espécies estuarinas e marinhas foram utilizadas em países diferentes, nomeadamente:

Leiostomus xanthurus
Cyprinodon variegatus
Menidia beryllina
Cymatogaster aggregata
Parophrys vetulus
Leptocottus armatus
Gasteroteus aculeatus
Dicentracus labrax
Alburnus alburnus.

Obtenção dos peixes

Os peixes de água doce referidos no quadro supra são de fácil reprodução, encontrando-se disponíveis todo o ano, enquanto que a disponibilidade de algumas das espécies marinhas e estuarinas se encontra limitada a determinados países. Os peixes de água doce podem ser criados em explorações piscícolas ou no laboratório, em condições controladas no que respeita a doenças e parasitas, de modo a produzir animais saudáveis com uma linha parental conhecida. Estas espécies encontram-se disponíveis em várias partes do mundo.

▼B

Apêndice 3

Previsão da duração das fases de fixação e depuração

1. *Estimativa da duração da fase de fixação*

Antes de realizar o ensaio, pode obter-se uma estimativa de k_2 e, consequentemente, do tempo necessário para atingir o estado estacionário, com base em relações empíricas entre k_2 e o coeficiente de partição n-octanol/-água (P_{ow}) ou entre k_2 e a solubilidade em água(s).

A relação empírica que se segue permite obter, nomeadamente, uma estimativa de k_2 (expressa em dias^{-1}) (1):

$\log_{10}k_2 = 0{,}414\ \log_{10}(P_{ow}) + 1{,}47\ (r^2 = 0{,}95)$ (equação 1)

A referência (2) inclui outras equações.

Caso o coeficiente de partição (P_{ow}) não seja conhecido, pode obter-se uma estimativa (3) com base na solubilidade em água da substância em estudo:

$\log_{10}(P_{ow}) = 0{,}862\ \log_{10}(s) + 0{,}710\ (r^2 = 0{,}994)$ (equação 2)

em que

s = solubilidade (moles/l): (n = 36).

As equações apenas são aplicáveis a substâncias com valores de log P_{ow} compreendidos entre 2 e 6,5 (4).

Pode obter-se o tempo necessário para atingir uma determinada percentagem do estado estacionário a partir do valor de k_2 estimado, com base na equação cinética que descreve a fixação e a depuração (assumindo uma cinética de primeira ordem):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

ou, para C_w constante:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w\ (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{(equação 3)}$$

Na vizinhança do estado estacionário ($t \rightarrow \infty$), a equação 3 pode reduzir-se a (5) (6):

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \text{ ou } C_f/C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}$$

O valor $k_1/k_2 \cdot C_w$ constitui uma estimativa da concentração nos peixes no estado estacionário «virtual» (C_{fs}).

A equação 3 pode transformar-se em:

$$C_f = C_{f,s}\ (1 - e^{-k_2 t}) \text{ or } \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{(equação 4)}$$

Aplicando a equação 4, pode prever-se o tempo necessário para atingir uma determinada percentagem do estado estacionário, utilizando o valor de k_2 determinado por intermédio da equação 1 ou 2.

▼B

Do ponto de vista estatístico, a duração óptima da fase de fixação para a obtenção de dados estatísticos fiáveis (BCF_k) consiste no período necessário para que a curva decorrente da representação gráfica do logaritmo da concentração da substância em estudo nos peixes em função do tempo, numa escala aritmética, atinja o ponto médio, ou $1,6/k_2$, ou 80 % do estado estacionário, mas não mais de $3,0/k_2$, ou 95 % do estado estacionário (7).

O tempo necessário para atingir 80 % do estado estacionário é dado por (equação 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ or } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \qquad \text{(equação 5)}$$

Do mesmo modo, o tempo necessário para atingir 95 % do estado estacionário é dado por:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \qquad \text{(equação 6)}$$

Por exemplo, a duração da fase de fixação (up) de uma substância com log P_{ow} = 4, é calculada do seguinte modo, por recurso às equações 1, 5 e 6:

$\log_{10} k_2 = - 0,414.(4) + 1,47 \qquad k_2 = 0,652$ dias

up (80 %) = 1,6/0,652, ou seja, 2,45 dias (59 horas)

ou up (95 %) = 3,0/0,652, ou seja, 4,60 dias (110 horas)

Do mesmo modo, a duração da fase de fixação de uma substância com s = 10^{-5} mal/l [log(s) = - 5,0], é calculada por recurso as equações 1, 2, 5 e 6:

$\log_{10} (P_{ow}) = - 0,862 \cdot (- 5,0) + 0,710 = 5,02$

$\log_{10} k_2 = - 0,414 \cdot (5,02) + 1,47$

$k_2 = 0,246$ dias^{-1}

up (80 %) = 1,6/0,246, ou seja, 6,5 dias (156 horas)

ou up (95 %) = 3,0/0,246, ou seja, 12,2 dias (293 horas)

Como alternativa,

$t_{eq} = 6,54 \times 10^3 P_{ow} + 55,31$ (horas)

pode utilizar-se a expressão seguinte para o cálculo do tempo necessário para atingir o estado estacionário real (4):

2. *Estimativa da duração da fase de depuração*

Com base na equação geral que descreve a fixação e a depuração de acordo com uma cinética de primeira ordem, pode obter-se uma estimativa do tempo necessário para reduzir a carga corporal de uma determinada percentagem da concentração inicial (1) (8).

Na fase de depuração, a concentração C_w deve ser nula, pelo que a equação pode reduzir-se a:

$$\frac{dC_f}{dt} = - k_2 C_f \text{ or } C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

▼B

em que $C_{f.o}$ representa a concentração no início do período de depuração. O tempo necessário para atingir 50 % da depuração (t_{50}) é dado por:

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \text{ or } t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Do mesmo modo, o tempo necessário para atingir 95 % de depuração será:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Caso se utilize um valor correspondente a 80 % da fixação no primeiro período ($1,6/k_2$) e a 95 % da depuração na fase respectiva ($3,0/k_2$), a duração da fase de depuração é aproximadamente dupla da duração da fase de fixação.

Deve sublinhar-se, todavia, que as estimativas em causa apenas são válidas para perfis de fixação e depuração que sigam uma cinética de primeira ordem. Caso se demonstre que tal não sucede, deve recorrer-se a modelos mais complexos [por exemplo, referência (1)].

Referências

(1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem. 1, p. 309-320.

(2) Kristensen P. (1991). Bioconcentration is fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

(3) Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982). Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. Environ: Sci. Technol. 16 (1), p. 4-10.

(4) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), p. 701-707.

(5) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), p. 785-792.

(6) Ernst W. (1985). Accumulation in Aquatic Organisms. In: Appraisal of tests to predict the environne- mental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H., Part 4.4, p. 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd, New York.

(7) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, Can. J. Chem. Eng. 55, p. 614-622.

(8) Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980). Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of Six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, p. 3-19.

▼B

Apêndsice 4

Exemplo de calendário de amostragem aplicável aos ensaios de bioconcentração de substâncias com log P_{ow} = 4

Recolha de amostras de peixes	Calendário de amostragem		Número de amostras adicionais	Número de peixes por amostra
	Frequência mínima necessária (dias)	Recolha de amostras adicionais		
Fase de fixação	- 1 0		2 (*) 2	45-80 peixes
1.ª	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2.ª	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3.ª	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4.ª	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5.ª	4,7		2	6
Fase de depuração				Transferência dos peixes para uma célula com água isenta da substância em estudo
6.ª	5,0	5,3		4 (4)
7.ª	5,9	7,0		4 (4)
8.ª	9,3	11,2		4 (4)
9.ª	14,0	17,5		6 (4)

(*) Recolher as amostras de água após, pelo menos, três renovações do volume da célula.

Os valores entre parêntesis correspondem ao número de amostras de água e de peixes a recolher caso se proceda a uma amostragem suplementar.

Nota:: O valor estimado de k_2 para log P_{ow} = 4,0 é de0,652dias^{-1}. A duração total do ensaio é dada por: 3 × up = 3 × 4,6 dias = 14 dias. Para o cálculo do factor «up», consultar o apêndice 3.

▼B

Apêndice 5

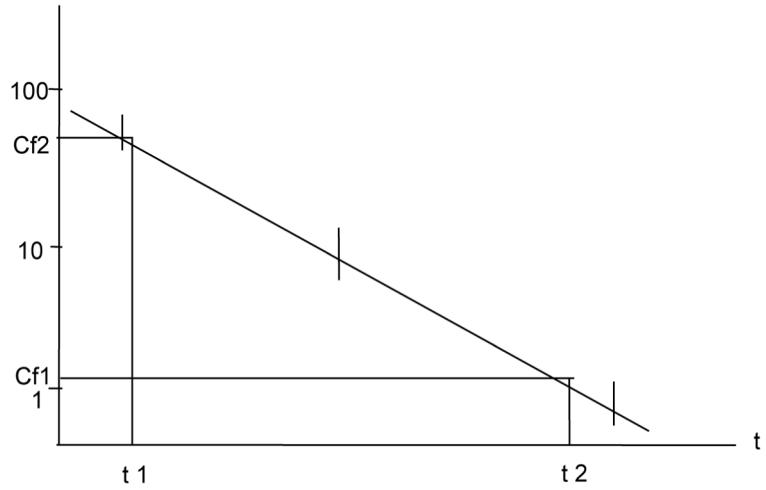
Descrição do modelo

Considera-se que a maioria dos dados referentes à bioconcentração são razoavelmente descritos por recurso a um modelo simples do tipo «dois compartimentos/-dois parâmetros», baseado na linearidade da curva obtida na representação gráfica em papel semilogarítmico das concentrações nos peixes durante a fase de depuração em função do tempo. Caso não se obtenha uma curva linear, devem utilizar-se processos mais complexos, nomeadamente o processo descrito por Spacie e Hamelink (referência 1 do apêndice 3).

Método gráfico para a determinação da constante de velocidade de depuração, k_2

Representar graficamente, em papel semilogarítmico, a concentração da substância em estudo nas diversas amostras de peixe em função dos tempos de amostragem. O declive da curva obtida fornece o valor de k_2.

$$k_2 = \frac{\ln (C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Deve sublinhar-se que quaisquer eventuais desvios à linearidade podem constituir indicação de um perfil de depuração mais complexo que o descrito por uma cinética de primeira ordem, podendo também aplicar-se métodos gráficos no caso de processos de depuração que não exibam uma cinética de primeira ordem.

Método gráfico para a determinação da constante de velocidade de fixação, k_1

Conhecida a constante k_2 calcular k_1 do seguinte modo:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{equação 1}$$

O valor de C_f é obtido a partir do ponto médio da curva de fixação obtida na representação gráfica do logaritmo da concentração em função do tempo.

▼B

Método computacional para o cálculo das constantes de velocidade de fixação e de depuração

O processo mais adequado para obter o factor de bioconcentração, bem como as constantes k_1 e k_2, consiste no recurso a métodos computacionais de estimativa não linear. Os programas utilizados permitem obter valores para k_1 e k_2 a partir de uma série sequencial de dados tempo/concentração, aplicando o seguinte modelo teórico:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{equação 2}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}\right) \quad t > t_c \qquad \text{equação 3}$$

em que t_c = tempo decorrido até ao final da fase de fixação.

A abordagem em causa permite obter uma estimativa de k_1 e k_2 com base no desvio-padrão.

Uma vez que, na maioria dos casos, a constante k_2 pode ser estimada a partir da curva de depuração com uma precisão relativamente elevada, determinando-se em simultâneo a forte correlação existente entre os parâmetros k_1 e k_2, pode ser aconselhável começar por calcular k_2 apenas com base nos dados de depuração, calculando posteriormente k_1 a partir dos dados de fixação, por recurso a um método de regressão não linear.

▼B

C.14. ENSAIO DE CRESCIMENTO JUVENIL EM PEIXES

1. MÉTODO

O presente método de ensaio de toxicidade no crescimento baseia-se na publicação OECD TG 215 (2000) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente ensaio, concebido para avaliar os efeitos da exposição prolongada a substâncias químicas no crescimento de peixes juvenis, baseia-se num método desenvolvido e testado na União Europeia através de um ensaio interlaboratorial (1) (3) e destinado a determinar os efeitos de substâncias químicas no crescimento de juvenis de truta arco-íris *(Oncorynchus mykiss)* em condições de escoamento. Podem usar-se para ensaio outras espécies relativamente às quais existam obras de referência. As publicações sobre ensaios de crescimento em peixe-zebra *(Danio rerio*) (2) (4) (5) e em peixinho dos arrozais *(Oryzias latipes*) (6) (7) (8), por exemplo, contêm informações úteis para este tipo de estudos.

Ver também a introdução geral, parte C.

1.2. DEFINIÇÕES

Menor concentração com efeito observável (MCCEO): é a menor concentração de ensaio da substância a ensaiar para a qual se observa um efeito significativo (a $p < 0,05$) quando comparado com o controlo. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à MCCEO devem ter um efeito prejudicial igual ou superior ao verificado com a MCCEO.

Concentração sem efeito observável (CSEO): é a concentração de ensaio cujo valor se situa imediatamente abaixo do valor da MCCEO.

$\mathbf{EC_x}$ no presente método de ensaio, é a concentração da substância de ensaio que causa uma variação de x % na taxa de crescimento dos peixes relativamente aos controlos.

Taxa de carga: é o peso fresco de peixe por volume de água.

Densidade de ocupação: é o número de peixes por volume de água.

Taxa específica de crescimento individual de um peixe: expressa a taxa de crescimento de um indivíduo relativamente ao seu peso inicial.

Taxa específica média de crescimento de um tanque: expressa a taxa média de crescimento da população de um tanque para uma dada concentração da substância de ensaio.

Taxa de crescimento pseudo-específica: expressa a taxa de crescimento individual relativamente ao valor médio do peso inicial da população do tanque.

▼B

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Os peixes juvenis em fase exponencial de crescimento são pesados, colocados em câmaras de ensaio e expostos a uma gama de concentrações subletais da substância de ensaio dissolvida em água. O ensaio deverá realizar-se preferencialmente em condições de escoamento; se tal não for possível, poderão usar-se condições semiestáticas (estático — renovação) apropriadas. A duração do ensaio é de 28 dias. Os peixes são alimentados diariamente. A quantidade de alimento fornecido aos peixes é calculada com base no seu peso inicial e pode ser reavaliada decorridos 14 dias de ensaio. No final do ensaio, os peixes são pesados novamente. Os efeitos nas taxas de crescimento são analisados por meio de um modelo de regressão, de forma a estimar a concentração que provocaria uma variação de x % na taxa de crescimento, ou seja, CEx (por exemplo, CE10, CE20 ou CE30). Em alternativa, os dados podem ser comparados com valores de controlo, de modo a determinar a menor concentração com efeito observável (MCCEO) e, a partir desse valor, a concentração sem efeito observável (CSEO).

1.4. INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA DE ENSAIO

Deverão estar disponíveis resultados de um ensaio de toxicidade aguda (ver método de ensaio C.1.) realizado de preferência com a espécie escolhida para este ensaio, o que implica que a solubilidade em água e a pressão de vapor da substância de ensaio são conhecidas, e que existe um método analítico fiável para a quantificação da substância nas soluções a ensaiar, relativamente ao qual a exactidão e o limite de detecção são conhecidos e se encontram descritos.

A fórmula estrutural, o grau de pureza, a estabilidade em água, a estabilidade à luz, os valores de pK_a e P_{ow} e os resultados de um ensaio de biodegradabilidade «fácil» da substância de ensaio constituem informações úteis (ver método de ensaio C.4).

1.5. VALIDADE DO ENSAIO

Um ensaio é considerado válido quando são cumpridas as seguintes condições:

— no(s) controlo(s), a mortalidade no final do ensaio não deverá ser superior a 10 %,

— o aumento do peso médio dos peixes no(s) controlo(s) deverá ser suficiente para permitir a detecção da mínima variação da taxa de crescimento considerada significativa. Os resultados de um ensaio interlaboratorial (3) demonstraram que, para a truta arco-íris, o peso médio dos peixes nos controlos deve sofrer, ao longo de 28 dias, um aumento que seja, no mínimo, equivalente a metade (isto é, a 50 %) do seu peso médio inicial; por exemplo, peso inicial: 1 g/peixe (= 100 %), peso final após 28 dias: ≥ 1,5 g/peixe (≥ 150 %),

— a concentração do oxigénio dissolvido deve ser igual ou superior a 60 % do valor da saturação com ar (VSA) ao longo de todo o ensaio,

— a variação da temperatura da água não deve ser superior a ± 1 °C entre as diferentes câmaras de ensaio em qualquer momento do ensaio nem deverá ultrapassar um intervalo de 2 °C dentro das gamas de temperatura especificadas para as espécies a ensaiar (apêndice 1).

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Equipamento**

Equipamento normal de laboratório e, mais especificamente, o seguinte:

a) Medidores de oxigénio e de pH;

▼B

b) Equipamento para determinação da dureza e alcalinidade da água;

c) Aparelhos apropriados para o controlo da temperatura e que permitam, de preferência, a sua monitorização contínua;

d) Tanques construídos com um material quimicamente inerte e de capacidade adequada à carga e à densidade de ocupação recomendadas (ver ponto 1.8.5 e apêndice 1);

e) Balança de precisão apropriada (isto é, com uma exactidão de ± 0,5 %).

1.6.2. **Água**

Qualquer água que sustente a sobrevivência e o crescimento adequados a longo prazo, da espécie em ensaio, poderá ser utilizada como água de ensaio. A qualidade da água deve ser mantida constante durante o ensaio. Os valores de pH devem situar-se entre 6,5 e 8,5, não devendo, num dado ensaio, sofrer variações superiores a ± 0,5 pH unidades. Recomenda-se uma dureza superior a 140 mg/l (expressos em $CaCO_3$). Para assegurar que a água de diluição não influencie indevidamente o resultado do ensaio (por complexação da substância de ensaio, por exemplo), deverão ser regularmente retiradas amostras para análise. Devem efectuar-se medições de metais pesados (por exemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd e Ni), principais aniões e catiões (por exemplo, Ca, Mg, Na, K, Cl e SO_4), pesticidas (por exemplo, pesticidas organofosforados totais e organoclorados totais), carbono orgânico total e sólidos em suspensão. Nos casos em que se sabe que a água de diluição mantém uma qualidade relativamente constante, estas medições deverão ser efectuadas, por exemplo, de três em três meses. Caso se demonstre que a qualidade da água se mantém inalterada durante, pelo menos, um ano, as determinações podem ser menos frequentes (de seis em seis meses, por exemplo). No apêndice 2 apresentam-se algumas características químicas de uma água de diluição aceitável.

1.6.3. **Soluções de ensaio**

As soluções de ensaio com as concentrações escolhidas são preparadas por diluição de uma solução de reserva.

A solução de reserva deve ser preparada, preferencialmente, apenas por mistura ou agitação da substância de ensaio na água de diluição, utilizando meios mecânicos (agitação ou dispersão ultra-sónica, por exemplo). Podem ser utilizadas colunas de saturação (colunas de solubilidade) para obter uma solução de reserva concentrada adequada.

Em alguns casos, pode ser necessário utilizar solventes ou dispersantes (agentes solubilizantes) para produzir uma solução de reserva com a concentração adequada. A acetona, o etanol, o metanol, o dimetilsulfóxido, a dimetilformamida e o trietilenoglicol são exemplos de solventes adequados. Dispersantes adequados são, por exemplo, o Cremofor RH40, o Tween 80, a metilcelulose a 0,01 % e o HCO-40. Deve ter-se cuidado ao utilizar agentes facilmente biodegradáveis (como a acetona, por exemplo) e/ou compostos altamente voláteis, uma vez que estes podem causar problemas relacionados com o desenvolvimento de bactérias nos ensaios em que for utilizado o método de escoamento. Quando se utiliza um agente solubilizante, este não deve afectar de forma significativa o crescimento dos peixes, nem produzir efeitos adversos observáveis nos juvenis, de acordo com um controlo na presença apenas do solvente.

▼B

Para os ensaios por escoamento, é necessário utilizar um sistema que distribua e dilua continuamente a solução de reserva da substância de ensaio (por exemplo, uma bomba de medição, um diluidor proporcional ou um sistema saturador), por forma a fornecer uma série de concentrações às câmaras de ensaio. As taxas de fluxo das soluções de reserva e da água de diluição devem ser verificadas a intervalos regulares durante o ensaio, de preferência diariamente, e não devem variar mais do que 10 % ao longo do ensaio. Os resultados de um ensaio interlaboratorial demonstraram que, para a truta arco-íris, é adequado utilizar uma frequência de remoção de água de 6 l/g de peixe/dia (ver ponto 1.8.2.2).

Para os ensaios semiestáticos (de renovação), a frequência de renovação do meio dependerá da estabilidade da substância de ensaio. No entanto, recomenda-se uma renovação diária da água. Se, a partir de ensaios de estabilidade preliminares (ver ponto 1.4), se demonstrar que a concentração da substância de ensaio não é estável (isto é, se estiver fora da gama de 80-120 % do valor nominal ou se for inferior a 80 % da concentração medida inicialmente) durante o período de renovação, deve considerar-se a utilização de um ensaio por escoamento.

1.6.4. **Selecção de espécies**

A espécie recomendada para o presente ensaio é a truta arco-íris *(Oncorhynchus mykiss),* uma vez que a maior parte da informação disponível foi obtida a partir de ensaios interlaboratoriais realizados com esta espécie (1) (3). Podem ser usadas outras espécies relativamente às quais exista documentação de referência embora o método de ensaio possa ter de ser adaptado de modo a proporcionar as condições de ensaio adequadas. Por exemplo, existem obras de referência relativas ao peixe-zebra *(Danio rerio)* (4) (5) e ao peixinho dos arrozais (*Oryzias latipes*) (6) (7) (8). Neste caso, o relatório deverá indicar o critério para a selecção das espécies e o método experimental.

1.6.5. **Confinação dos peixes**

Os peixes de ensaio devem ser seleccionados a partir da população de uma única reserva (de preferência proveniente da mesma desova), que tenha sido mantida em condições de qualidade da água e de iluminação idênticas às usadas no ensaio durante, pelo menos, as duas semanas anteriores à sua realização. Durante o período de confinação e no decorrer do ensaio, os peixes devem ser alimentados preferencialmente com uma ração equivalente a 4 % do peso corporal por dia; no mínimo, a ração diária deverá corresponder a 2 % do peso corporal.

Decorrido um período inicial de 48 h deverá registar-se a mortalidade e aplicar os seguintes critérios:

— mortalidade superior a 10 % da população num período de sete dias: o lote é rejeitado na sua totalidade,

— mortalidade de 5 % a 10 % da população: aclimatação durante um período adicional de sete dias: caso se verifique mortalidade superior a 5 % durante este segundo período, deverá rejeitar-se a totalidade do lote,

— mortalidade inferior a 5 % da população num período de sete dias: o lote é aceite.

Os peixes não devem receber qualquer tratamento de doenças nas duas semanas anteriores ao ensaio nem durante a realização do mesmo.

▼B

1.7. PLANEAMENTO DO ENSAIO

O «planeamento do ensaio» consiste na escolha do número e intervalos das concentrações de ensaio, do número de tanques para cada concentração e do número de peixes por tanque. Um planeamento de ensaio correctamente elaborado deverá considerar os seguintes aspectos:

a) O objectivo do estudo;

b) O método de análise estatística a utilizar;

c) A disponibilidade e o custo dos meios experimentais.

A definição do objectivo deverá, se possível, especificar o rigor estatístico para o qual é necessário ocorrer uma determinada diferença, de modo a ser detectada (na taxa de crescimento, por exemplo). Em alternativa, poderá especificar a precisão com que será necessário determinar a CE_X de modo a permitir a sua estimativa (por exemplo, com x = 10, 20 ou 30; de preferência, o valor de x não deve ser inferior a 10). Se nenhuma destas informações for disponibilizada, não será possível dar uma indicação correcta da dimensão do estudo.

Importa ter presente que um planeamento considerado óptimo (ou seja, o que utiliza da melhor forma os recursos disponíveis) para análise através de um dado método estatístico poderá não o ser para outro método. Assim, um planeamento concebido para determinação da MCCEO/CSEO não será idêntico a um outro concebido para análise por regressão.

Na maioria dos casos, pelas razões analisadas por Stephan e Rogers (9), considera-se que a análise de regressão é preferível à análise de variância. No entanto, no caso de não se encontrar um modelo de regressão adequado ($r^2 < 0,9$), deverá usar-se a estimativa de CSEO/-MCCEO.

1.7.1. **Planeamento para análise por regressão**

O planeamento de um ensaio a analisar por regressão deverá considerar os seguintes aspectos:

a) As concentrações testadas no ensaio deverão, obrigatoriamente, incluir as concentrações às quais se observam determinadas percentagens de efeito (por exemplo, $CE_{10,20,30}$) e abranger a gama de concentrações para as quais o efeito da substância de ensaio é significativo. As estimativas das concentrações responsáveis por determinadas percentagens de efeito poderão ser feitas com maior precisão se os respectivos valores se localizarem a meio da gama de concentrações ensaiadas. A realização de um ensaio preliminar para determinação da gama de concentrações poderá ser útil na escolha das concentrações de ensaio apropriadas;

b) De modo a permitir a aplicação de um modelo estatístico, o ensaio deve incluir, no mínimo, um tanque de controlo e cinco tanques adicionais com diferentes concentrações da substância de ensaio. Caso se utilize um agente solubilizante, o ensaio deverá incluir, além da série de ensaio, um controlo contendo o agente solubilizante na maior das concentrações testadas no ensaio (ver pontos 1.8.3 e 1.8.4);

c) Embora se possam utilizar séries geométricas ou séries logarítmicas adequadas (10) (ver apêndice 3), recomenda-se o espaçamento logarítmico das concentrações de ensaio;

▼B

d) Se existirem mais do que seis tanques, os tanques excedentes devem ser usados para repetição ou distribuídos ao longo da gama de concentrações de forma a reduzir o intervalo entre níveis. Não há preferência por qualquer destes procedimentos.

1.7.2. **Planeamento para a estimativa de CSEO/MCCEO através de análise de variância (ANOVA)**

Sempre que possível, devem usar-se repetições dos tanques correspondentes a cada concentração; a análise estatística deve efectuar-se ao nível de cada tanque (11). Sem repetições, não é possível analisar a variabilidade entre tanques, mas apenas a atribuível à variabilidade entre cada um dos elementos da população. No entanto, os resultados de um estudo publicado (12) demonstraram que, no caso examinado, a variabilidade entre tanques era muito pequena quando comparada com a variabilidade dentro de cada tanque (isto é, entre os peixes de um tanque). Assim, considera-se a realização de análise estatística a nível individual uma alternativa relativamente aceitável.

Convencionalmente, utilizam-se pelo menos cinco concentrações de ensaio de uma série geométrica com um factor que, de preferência, não deverá ser superior a 3,2.

Em geral, em ensaios com tanques repetidos, o número de repetições de tanques de controlo (e portanto, o número de peixes) deverá ser o dobro do usado em cada uma das concentrações de ensaio, as quais deverão ser de dimensão idêntica (13) (14) (15). Em contrapartida, na ausência de tanques repetidos, o número de peixes no grupo de controlo deve ser idêntico ao usado em cada concentração de ensaio.

Caso se utilize uma ANOVA baseada em tanques e não em indivíduos (o que implicaria a marcação individual dos peixes ou o uso de taxas de crescimento pseudo-específicas (ver ponto 2.1.2), o ensaio deverá incluir as repetições necessárias para a determinação do desvio-padrão relativo aos «tanques nas mesmas concentrações». Assim sendo, a estimativa do erro na análise de variância deverá considerar, no mínimo, cinco graus de liberdade (11). Se o ensaio incluir apenas repetições dos controlos, a variabilidade do erro poderá ser desviada, uma vez que pode aumentar com o valor médio da taxa de crescimento em questão. Dado ser provável que a taxa de crescimento diminua com o aumento da concentração, esta situação poderá conduzir a uma sobrestimação da variabilidade.

1.8. PROCEDIMENTO

1.8.1. **Selecção e pesagem dos peixes de ensaio**

É importante minimizar a variação entre o peso de cada peixe no início do ensaio. O apêndice 1 contém as gamas de pesos aceitáveis para as diferentes espécies recomendadas para uso neste ensaio. A gama de pesos individuais em todo o lote de peixes no início do ensaio deve situar-se, de preferência, dentro dos limites de ± 10 % da média aritmética dos pesos, não devendo, em circunstância alguma, exceder os 25 %. Por forma a estimar o peso médio, recomenda-se a pesagem de uma amostra do lote de peixe antes de dar início ao ensaio.

▼B

A população de reserva deve ser privada de alimento durante as 24 horas que antecedem o início do ensaio. Os peixes deverão então ser escolhidos de forma aleatória. Utilizando um anestésico geral (por exemplo, uma solução aquosa de 100 mg/l de metanosulfonato de tricaína [MS 222], neutralizada por adição de duas partes de bicarbonato de sódio por cada parte de MS 222), os peixes devem ser pesados individualmente por forma a determinar o peso fresco (secos com papel absorvente) com a precisão indicada no apêndice 1. Os peixes cujo peso se encontre dentro da gama pretendida são seleccionados e distribuídos aleatoriamente pelos recipientes de ensaio. Deve registar-se o peso fresco total dos peixes em cada recipiente. O uso de anestésicos e a manipulação (incluindo a secagem com papel e a pesagem) podem causar tensão ou danos físicos nos peixes juvenis, especialmente em espécies de pequeno tamanho. Por essa razão, a manipulação dos juvenis deverá ser feita com o máximo cuidado para se evitarem esses efeitos nos animais do ensaio.

Os peixes voltam a ser pesados no 28.º dia de ensaio (ver ponto 1.8.6). No entanto, caso se considere necessário recalcular a ração alimentar, pode efectuar-se uma pesagem adicional no 14.º dia de ensaio (ver ponto 1.8.2.3). A detecção de alterações no tamanho dos peixes, a partir dos quais se possam ajustar as rações alimentares, poderá ser efectuada através de outros métodos, tais como a fotografia.

1.8.2. **Condições de exposição**

1.8.2.1. *Duração*

A duração mínima do ensaio é de 28 dias.

1.8.2.2. *Taxas de carga e densidades de ocupação*

É importante que a taxa de carga e a densidade de ocupação sejam adequadas à espécie usada no ensaio (ver apêndice 1). Uma densidade de ocupação demasiado elevada poderá dar origem a perturbações por superlotação, causadoras de reduções nas taxas de crescimento e, possivelmente, de doenças. Por outro lado, o uso de baixas densidades de ocupação poderá induzir comportamentos territoriais, que poderão também afectar o crescimento. Em todo o caso, a taxa de carga deverá ser suficientemente baixa para permitir manter uma concentração de oxigénio dissolvido de pelo menos 60 % VSA sem arejamento. Um ensaio interlaboratorial (3) demonstrou que, para a truta arco-íris, é adequado utilizar uma taxa de carga de 16 trutas de 3-5 g num volume de 40 1. A frequência de remoção de água recomendada durante o período de ensaio é de 6 l/g de peixe/dia.

1.8.2.3. *Alimentação*

Os peixes devem ser nutridos com um alimento apropriado (apêndice 1), administrado a um ritmo suficiente para induzir uma taxa de crescimento aceitável. Deverão ser tomadas as precauções necessárias para evitar o crescimento de microorganismos e a turbidez da água. No caso da truta arco-íris, considera-se adequada uma quantidade diária correspondente a 4 % do seu peso corporal (3) (16) (17) (18). A ração diária pode ser dividida em duas porções iguais, que serão fornecidas aos peixes em duas tomas separadas por um intervalo mínimo de cinco horas. O cálculo da ração baseia-se no peso total inicial dos peixes em cada recipiente. No caso de se efectuar uma segunda pesagem dos peixes no 14.º dia de ensaio, poderá efectuar-se um novo cálculo da ração alimentar. Os peixes devem ser privados de alimento durante o período de 24 horas que antecede a pesagem.

▼B

Os alimentos não consumidos e a matéria fecal devem ser removidos diariamente dos recipientes de ensaio, limpando-se cuidadosamente o fundo de cada tanque com um sistema de sucção.

1.8.2.4. *Luz e temperatura*

O fotoperíodo e a temperatura da água do ensaio devem ser apropriados para a espécie de ensaio (apêndice 1).

1.8.3. **Concentrações de ensaio**

Normalmente, deverão ser utilizadas cinco concentrações da substância de ensaio, independentemente do planeamento do ensaio (ver ponto 1.7.2). O conhecimento prévio da toxicidade da substância de ensaio (obtido a partir de um ensaio de toxicidade aguda e/ou de um ensaio para determinação de gama de concentrações, por exemplo) deverá ajudar na selecção das concentrações de ensaio apropriadas. Deve fornecer-se uma justificação quando se utilizam menos de cinco concentrações. A concentração de ensaio mais elevada não deverá exceder o limite de solubilidade da substância em água.

Quando se utiliza um agente solubilizante para facilitar a preparação de soluções de reserva, a sua concentração final não deve ser superior a 0,1 ml/l e, de preferência, deverá ser a mesma em todos os recipientes de ensaio (ver ponto 1.6.3). No entanto, devem fazer-se todos os esforços para evitar a utilização destes produtos.

1.8.4. **Controlos**

O número de controlos em água de diluição depende do planeamento do ensaio (ver pontos 1.7-1.7.2). Se se utilizar um agente solubilizante, o ensaio deverá incluir controlos com essa substância em número idêntico aos controlos em água de diluição.

1.8.5. **Frequência das determinações analíticas e medições**

Durante o ensaio, as concentrações da substância de ensaio deverão ser determinadas a intervalos regulares (ver abaixo).

Nos ensaios por escoamento, as taxas de fluxo das soluções de reserva do agente de diluição e da substância tóxica devem ser verificadas a intervalos regulares, de preferência diariamente, não devendo variar mais do que 10 % ao longo do ensaio. Nos ensaios em que se espera que as concentrações da substância de ensaio se mantenham dentro de um intervalo de ± 20 % dos valores nominais (isto é, dentro da gama 80-120 %; ver pontos 1.6.2 e 1.6.3), recomenda-se que, no mínimo, a maior e a menor das concentrações de ensaio sejam analisadas no início do estudo e, a partir daí, semanalmente. Para os ensaios em que não se espera que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro do intervalo de ± 20 % do valor nominal (com base nos dados de estabilidade da substância), será necessário analisar todas as concentrações de ensaio, seguindo o mesmo regime.

Nos ensaios semiestáticos (de renovação), em que se espera que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro de um intervalo de ± 20 % do valor nominal, recomenda-se que, no mínimo, a maior e a menor das concentrações de ensaio sejam analisadas logo após a sua preparação e imediatamente antes da renovação, no início do estudo e, a partir daí, semanalmente. Para os ensaios em que não se espera que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro do intervalo de ± 20 % do valor nominal, será necessário analisar todas as concentrações de ensaio, seguindo um regime idêntico ao recomendado para substâncias mais estáveis.

▼B

Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. No entanto, caso existam provas de que a concentração da substância a ensaiar na solução se manteve, durante o ensaio, no intervalo de ± 20 % do valor nominal ou do valor da concentração inicial medida, os resultados poderão basear-se em valores nominais ou em valores medidos.

As amostras podem precisar de ser centrifugadas ou filtradas (utilizando um poro com 0,45 μm, por exemplo). Embora a centrifugação seja o procedimento recomendado, as amostras podem ser filtradas desde que o material de ensaio não adsorva aos filtros.

Durante o ensaio, o oxigénio dissolvido, o pH e a temperatura devem ser medidos em todos os recipientes de ensaio. A dureza total, a alcalinidade e a salinidade (se relevante) devem ser medidas nos controlos e num recipiente com a concentração mais elevada. O oxigénio dissolvido e a salinidade (se relevante) devem ser medidos três vezes (no início, a meio e no fim do ensaio). Nos ensaios semiestáticos, recomenda-se que o oxigénio dissolvido seja medido com maior frequência, de preferência antes e após cada renovação da água ou, pelo menos, uma vez por semana. O pH deve ser medido no início e no fim de cada renovação da água nos ensaios de renovação estática e, pelo menos, semanalmente nos ensaios por escoamento. A dureza e a alcalinidade devem ser medidas uma vez em cada ensaio. A temperatura deverá ser, de preferência, monitorizada continuamente, pelo menos, num recipiente de ensaio.

1.8.6. **Observações**

Peso: No fim do ensaio, todos os peixes sobreviventes devem ser pesados, avaliando-se o peso fresco (seco com papel absorvente). A pesagem pode ser feita individualmente ou em grupos por recipiente de ensaio; este último procedimento é preferível, uma vez que a pesagem em separado exige a marcação individual dos peixes. Se for necessário efectuar pesagens individuais para determinar taxas específicas de crescimento de cada um dos peixes, a técnica de marcação adoptada deverá evitar perturbar os animais (poderão utilizar-se alternativas a marcação por congelação, tais como a utilização de linha de pesca fina colorida).

Durante o período do ensaio, os peixes devem ser observados diariamente, devendo ser assinaladas quaisquer anomalias externas (tais como hemorragia, descoloração) ou comportamentos anómalos. A mortalidade deverá ser registada, e os peixes mortos retirados o mais rapidamente possível. Os peixes mortos não são substituídos, uma vez que a taxa de carga e a densidade de ocupação são suficientes para impedir que alterações no número de peixes por tanque afectem o crescimento. No entanto, a taxa de alimentação deverá ser reajustada.

2. **DADOS E RELATÓRIO**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Recomenda-se que um técnico estatístico participe tanto no planeamento como na análise do ensaio, uma vez que o método permite variações consideráveis no plano experimental no que se refere, por exemplo, ao número de recipientes de ensaio, ao número de concentrações de ensaio, ao número de peixes, etc. Devido às opções disponíveis quanto ao planeamento do ensaio, não se fornece qualquer orientação específica relativamente aos procedimentos estatísticos.

▼B

As taxas de crescimento não devem ser calculadas em recipientes de ensaio em que a mortalidade seja superior a 10 %. No entanto, deve indicar-se a taxa de mortalidade para todas as concentrações de ensaio.

Seja qual for o método utilizado na análise dos dados, o conceito fundamental é a taxa específica de crescimento r entre os tempos t_1 e t_2. Esta pode ser definida de várias formas, dependendo de os peixes serem ou não marcados individualmente, bem como da necessidade de determinar uma média por tanque.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

em que

r_1 = taxa específica de crescimento individual

r_2 = taxa específica de crescimento média por tanque

r_3 = taxa pseudo-específica de crescimento

w_1, w_2 = pesos de determinado peixe nos tempos t_1 e t_2, respectivamente

$\log_e w_1$ = logaritmo do peso de um indivíduo no início do período de estudo

$\log_e w_2$ = logaritmo do peso de um indivíduo no final do período de estudo

$\log_e W_1$ = média dos logaritmos dos valores de w_1 para os peixes do tanque no início do período de estudo

$\log_e W_2$ = média dos logaritmos dos valores de w_2 para os peixes do tanque no final do período de estudo

t_1, t_2 = tempo (em dias) no início e no final do período de estudo

As taxas r_1, r_2, r_3 podem ser calculadas para o período «dia 0-dia 28», e, quando apropriado (isto é, quando se efectuaram medições no 14.º dia de ensaio), para os períodos «dia 0-dia 14» e «dia 14-dia 28».

2.1.1. **Análise de resultados por regressão (modelo concentração-resposta)**

Este método de análise estabelece uma relação matemática adequada entre a taxa específica de crescimento e a concentração, permitindo a determinação da «CE_x», ou seja, de qualquer valor de CE. Utilizando este método não é necessário calcular o valor individual de r (r_1) e, em vez disso, a análise pode basear-se no valor médio de r por tanque (r_2). Este último procedimento é considerado preferível, e também mais adequado a espécies de menores dimensões.

As taxas específicas de crescimento médias por tanque (r_2) devem ser representadas graficamente em função da concentração, de forma a observar a relação concentração-resposta.

▼B

A relação entre r_2 e a concentração deve ser expressa através de um modelo apropriado, cuja escolha deve ser bem fundamentada.

Se os números de peixes sobreviventes em cada tanque forem diferentes, o procedimento de ajuste do modelo (seja este simples ou não linear) deverá ser ponderado por forma a permitir grupos de diferentes dimensões.

O método de ajuste do modelo deve permitir estimar, por exemplo, o valor de CE_{20} e da respectiva dispersão (erro-padrão ou intervalo de confiança). O gráfico do modelo ajustado deve ser apresentado em conjunto com os dados, de modo a permitir observar a adequação do ajuste realizado (9) (19) (20) (21).

2.1.2. **Análise de resultados para a determinação da MCCEO**

Caso o ensaio tenha incluído repetições dos tanques para todas as concentrações, a estimativa da MCCEO pode basear-se numa análise de variância (ANOVA) da taxa específica de crescimento média dos tanques (ver ponto 2.1), seguida da aplicação de um método apropriado de comparação entre o r médio para cada concentração e o r médio dos controlos [por exemplo, o teste de Dunnett ou o teste de Williams (13) (14) (15) (22)], a fim de identificar a menor concentração para a qual a diferença entre os dois valores é significativa a uma probabilidade de 0,05. Se não se verificarem os requisitos exigidos pelos métodos paramétricos — distribuição não normal (teste de Shapiro-Wilk, por exemplo) ou variância heterogénea (teste de Bartlett) –, poderá ser equacionada a transformação dos dados de forma a homogeneizar as variâncias antes de efectuar a ANOVA. Em alternativa, poderá realizar-se uma ANOVA ponderada.

Na ausência de repetições dos tanques para cada concentração, uma ANOVA com base em dados de tanques será insensível ou impossível. Nestes casos, um compromisso aceitável será a realização da ANOVA com base nos valores individuais da taxa pseudo-específica de crescimento r_3.

O valor médio de r_3 para cada concentração de ensaio poderá depois ser comparado com o valor médio de r_3 para os controlos, podendo a MCCEO ser determinada de acordo com o procedimento acima descrito. Importa salientar que este método não tem em conta a variabilidade entre tanques, para além da que é devida à variabilidade entre indivíduos. No entanto, os resultados de um estudo publicado (9) demonstraram que a variabilidade entre tanques era muito pequena quando comparada com a variabilidade em cada tanque (ou seja, entre os peixes de um tanque). Se a análise não considerar os peixes de forma individual, deverá ser indicado o método de identificação de aberrações, bem como uma justificação para a sua utilização.

2.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados devem ser interpretados com precaução quando as concentrações tóxicas medidas nas soluções de ensaio ocorrem em níveis perto do limite de detecção do método analítico. A interpretação dos resultados de ensaios semiestáticos, em que a concentração da substância de ensaio diminui entre o momento em que a solução é preparada e a renovação, deve igualmente ser efectuada com precaução.

2.3. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

▼B

2.3.1. **Substância de ensaio:**

— natureza física e propriedades físico-químicas relevantes,

— dados de identificação química, incluindo o grau de pureza e o método analítico de quantificação da substância de ensaio, quando apropriado.

2.3.2. **Espécie de ensaio:**

— nome científico, se possível,

— estirpe, dimensões, fornecedor, tratamentos prévios, etc.

2.3.3. **Condições de ensaio:**

— procedimento de ensaio utilizado (por exemplo, semiestático/renovação, por escoamento, carga, densidade de ocupação, etc.),

— planeamento do ensaio (por exemplo, o número de recipientes de ensaio, concentrações de ensaio e repetições, número de peixes por recipiente),

— método de preparação das soluções de reserva e frequência de renovação (quando utilizados, o agente solubilizante e a sua concentração devem ser indicados),

— valores nominais das concentrações de ensaio, médias dos valores medidos nos recipientes de ensaio e respectivos desvios-padrão, bem como o método através do qual estes foram obtidos; devem ainda ser fornecidas provas de que as medições se referem às concentrações da substância de ensaio em verdadeira solução,

— características da água de diluição: pH, dureza, alcalinidade, temperatura, concentração do oxigénio dissolvido, níveis de cloro residual (caso tenham sido medidos), carbono orgânico total, sólidos em suspensão, salinidade do meio de ensaio (caso tenha sido medida) e quaisquer outras medições efectuadas,

— qualidade da água dentro dos recipientes de ensaio: pH. dureza, temperatura e concentração do oxigénio dissolvido,

— informações pormenorizadas sobre a alimentação [por exemplo, tipo de alimento(s), proveniência, quantidade fornecida e frequência de administração].

2.3.4. **Resultados:**

— prova de que os controlos satisfazem os critérios de validade relativos à sobrevivência, bem como dados sobre a mortalidade observada em qualquer uma das concentrações ensaiadas,

— métodos de análise estatística utilizados, dados usados na análise estatística (repetições ou peixes), tratamento dos dados e justificação das técnicas usadas,

— tabelas contendo os dados relativos aos pesos individuais e médios dos peixes nos dias 0, 14 (caso tenham sido medidos) e 28, bem como os valores das taxas de crescimento médias por tanque ou pseudo-específicas (conforme seja apropriado) referentes aos períodos «dia 0-dia 28», ou, se possível, «dia 0-dia 14» e «dia 14-dia 28»,

— resultados da análise estatística (isto é, análise de regressão ou ANOVA), apresentados, de preferência, em tabelas de forma gráfica, bem como a MCCEO ($p = 0,05$) e a CSEO ou a CE_X; sempre que possível e apropriado, deverão indicar-se os erros-padrão,

▼B

— incidência de quaisquer reacções invulgares manifestadas pelos peixes e de quaisquer efeitos visíveis produzidos pela substância de ensaio.

3. REFERÊNCIAS

(1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Eish. WRc Report No PRD 1388-M/2.

(2) Meyer, A., Bierman, C. H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish *(Danio* rerio), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, pp. 231-236.

(3) Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(4) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, p. 1855-1870.

(5) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M, Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4--dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish *(Brachydanio rerio):* results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, p. 15 7-164.

(6) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(7) Holcombe, G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka *(Oryzias latipes).* Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, p. 287-297.

(8) Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka *(Oryzias latipes).* Ecological Research Series EPA--600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

(9) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, p. 328-338.

(10) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS l/RM/28, 81 p.

(11) Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(12) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(13) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, p. 1096-1121.

▼B

(14) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, p. 482-491.

(15) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27, p. 103-117.

(16) Johnston, W. L., Atkinson, J. I.., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. Aquaculture 120, p. 123-133.

(17) Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, p. 33-41.

(18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA, 288 pp.

(19) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, pp. 1485-1494.

(20) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L, Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(21) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(22) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, p. 510-531.

▼B

Apêndice 1

ESPÉCIES DE PEIXES RECOMENDADAS PARA ENSAIO E CONDIÇÕES DE ENSAIO APROPRIADAS

Espécie	Gama de temperaturas recomendada (ºC)	Fotoperíodo (horas)	Gama de pesos iniciais dos peixes recomendada (g)	Precisão de medição exigida	Taxa de carga (g/l)	Densidade de ocupação (por litro)	Alimentação	Duração do ensaio (dias)
Espécie recomendada:								
Oncorhynchus mykiss Truta arco-íris	12,5-16,0	12-16	1-5	100 mg	1,2-2,0	4	Alimento seco (comercial), preparado a partir de salmonídeos jovens	≥ 28
Outras espécies sobre as quais existe documentação:								
Danio rerio Peixe-zebra	21-25	12-16	0,050-0,100	1 mg	0,2-1,0	5-10	Alimento vivo (*Brachionus, Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes Peixinho dos arrozais	21-25	12-16	0,050-0,100	1 mg	0,2-1,0	5-20	Alimento vivo (*Brachionus, Artemia*)	≥ 28

▼B

Apêndice 2

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

Substância	Concentrações
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amónia não ionizada	< 1 µg/l
Cloro residual	< 10 µg/l
Total de pesticidas organofosforados	< 50 ng/1
Total de pesticidas organoclorados + bifenilos policlorados	< 50 ng/1
Cloro orgânico total	< 25 ng/1

▼B

Apêndice 3

Séries logarítmicas de concentrações apropriadas para ensaio de toxicidade (9)

Coluna (número de concentrações entre 100 e 10 ou entre 10 e 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Pode escolher-se uma série de cinco (ou mais) concentrações sucessivas de uma coluna. Os pontos intermédios entre as concentrações de uma coluna (x) encontram-se na coluna (2x + 1). Os valores listados podem representar concentrações expressas em percentagem por volume ou peso (mg/l ou µg/l). Os valores podem ser multiplicados ou divididos por qualquer potência de 10, conforme seja apropriado. Caso exista uma incerteza considerável relativamente ao nível de toxicidade, pode usar-se a coluna 1.

▼B

C.15. ENSAIO DE TOXICIDADE DE CURTO PRAZO NOS PEIXES EM ESTÁDIO EMBRIONÁRIO E RECÉM-NASCIDOS

1. MÉTODO

O presente método de ensaio de toxicidade de curto prazo baseia-se na publicação OECD TG 212 (1998) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente ensaio de toxicidade a curto prazo nos peixes em estádio embrionário e recém-nascidos é um ensaio de curto prazo, em que se testa a exposição em todas as fases do ciclo de vida desde o ovo recém-fertilizado até ao fim da fase de recém-nascido. Uma vez que, neste ensaio, não é fornecido qualquer alimento aos embriões e peixes recém-nascidos, o ensaio deve ser finalizado enquanto os peixes recém-nascidos ainda se alimentam a partir do saco vitelino.

Este ensaio destina-se a definir os efeitos letais e, até certo ponto, subletais de determinados produtos químicos nos estádios e espécies ensaiados. A informação obtida será útil na medida em que permite a) estabelecer uma ligação entre os ensaios letais e subletais; b) ser utilizado como um ensaio de despiste tanto para um ensaio relativo às primeiras fases de vida como para ensaios de toxicidade crónica; e c) ser utilizado para ensaios em espécies para as quais as técnicas de criação não estejam suficientemente avançadas de modo a abrangerem o período de mudança da alimentação endógena para a exógena.

Importa ter presente que, de um modo geral, só os ensaios que abrangem todos os estádios do ciclo de vida dos peixes são susceptíveis de proporcionar uma estimativa exacta da toxicidade crónica dos produtos químicos para estes animais e que a redução da exposição em qualquer estádio pode reduzir a sensibilidade e, por conseguinte, subestimar a toxicidade crónica. É então de esperar que os ensaios em embriões e peixes recém-nascidos sejam menos sensíveis que um ensaio que englobe todas as fases iniciais de vida, particularmente no respeitante a produtos químicos com elevada lipofilicidade (log P_{ow} > 4) e produtos químicos com um mecanismo específico de acção tóxica. No entanto, para produtos químicos com um mecanismo de acção narcótico não específico, esperam-se menores diferenças entre os dois ensaios em termos de sensibilidade (1).

Antes da publicação deste ensaio, a maior parte das experiências com embriões e peixes recém-nascidos foram realizadas com o peixe de água doce *Danio rerio* Hamilton-Buchanan *(Teleostei, Cyprinidae;* nome comum peixe-zebra). Por esta razão, é fornecida no apêndice 1 uma orientação mais pormenorizada sobre o ensaio com esta espécie, o que não exclui a utilização de outras espécies ensaiadas e relativamente às quais existem obras de referência (quadros 1A e 1B).

1.2. DEFINIÇÕES

Menor concentração com efeito observável (LOEC): é a menor concentração de ensaio da substância a ensaiar para a qual se observa um efeito significativo (a $p < 0,05$) quando comparado com o controlo. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior ao verificado com a NOEC.

Concentração sem efeito observável (NOEC): é a concentração de ensaio cujo valor se situa imediatamente abaixo do valor da LOEC.

▼B

1.3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

Os peixes em estádio embrionário e recém-nascidos são expostos a uma gama de concentrações da substância de ensaio dissolvida em água. No âmbito do protocolo, é possível escolher entre um método semi-estático e um método por escoamento. A escolha depende da natureza da substância de ensaio. O ensaio inicia-se colocando ovos fertilizados nas câmaras de ensaio e termina imediatamente antes de o saco vitelino de qualquer larva em qualquer das câmaras de ensaio ter sido completamente absorvido ou antes de ocorrer mortalidade nos controlos por falta de alimento. Os efeitos letais e subletais são avaliados e comparados com os valores de controlo de modo a determinar a menor concentração com efeito observável e, a partir daí, a concentração sem efeito observável. Em alternativa, podem ser analisados utilizando um modelo de regressão para estimar a concentração que provocaria uma dada percentagem de efeito (isto é a CL/CE_X, em que x é uma % de efeito definido).

1.4. INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA DE ENSAIO

Deverão estar disponíveis resultados de um ensaio de toxicidade aguda (ver método C.1) realizado de preferência com a espécie escolhida para este ensaio. Os resultados podem ser úteis para a selecção de uma gama apropriada das concentrações a testar no ensaio sobre as fases iniciais de vida. A solubilidade em água (incluindo a solubilidade na água do ensaio) e a pressão de vapor da substância de ensaio devem ser conhecidas. Deve ser possível utilizar um método analítico fiável para a quantificação da substância nas soluções a ensaiar, relativamente ao qual a exactidão e o limite de detecção sejam conhecidos e se encontrem descritos.

A fórmula estrutural da substância de ensaio, o seu grau de pureza, estabilidade à luz, estabilidade nas condições do ensaio, pKa, P_{ow} e os resultados de um ensaio para a biodegradabilidade «fácil» são informações úteis para o planeamento do ensaio (ver método C.4).

1.5. VALIDADE DO ENSAIO

Um ensaio é considerado válido quando são cumpridas as seguintes condições:

— o número total de ovos fertilizados vivos no grupo de controlo e, quando aplicável, nos recipientes-controlo para o solvente, deve ser igual ou superior aos limites definidos nos apêndices 2 e 3,

— a concentração do oxigénio dissolvido deve situar-se entre 60 e 100 % do valor da saturação com o ar (VSA) ao longo de todo o ensaio,

— a temperatura da água não deve variar mais do que ± 1,5 ºC entre as diferentes câmaras de ensaio ou entre dias sucessivos, em qualquer momento do ensaio, devendo ainda situar-se na gama de temperaturas especificada para as espécies a ensaiar (apêndices 2 e 3).

▼B

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Câmaras de ensaio**

Podem ser utilizados quaisquer recipientes de vidro ou outros recipientes em material quimicamente inerte. A dimensão dos recipientes deve ser suficiente para permitir cumprir os requisitos relativos à carga (ver ponto 1.7.1.2). Recomenda-se que as câmaras de ensaio sejam posicionadas de forma aleatória na área de ensaio. Quando em presença de efeitos sistemáticos no laboratório que possam ser controlados mediante a disposição por agrupamento, é preferível aplicar um esquema aleatório de disposição por agrupamento, com cada tratamento está presente em cada grupo, do que um esquema totalmente aleatório. A disposição das câmaras de ensaio por agrupamento, se utilizada, deve ser tomada em consideração na posterior análise de dados. As câmaras de ensaio devem estar protegidas contra perturbações indesejáveis.

1.6.2. **Selecção das espécies de peixes**

As espécies de peixes recomendadas encontram-se indicadas no quadro 1A. Poderão ser utilizadas outras espécies (exemplos no quadro 1B), mas o método de ensaio poderá ter de ser adaptado de modo a proporcionar condições de ensaio adequadas. Neste caso, o critério para a selecção das espécies e o método experimental deverão ser indicados no relatório.

1.6.3. **Confinação da descendência dos peixes**

Poderão ser encontradas indicações úteis sobre a confinação dos alevins em condições adequadas no OECD TG 210 ([1]) e nas referências bibliográficas (2), (3), (4), (5) e (6).

1.6.4. **Manuseamento de embriões e larvas**

Dentro do recipiente principal, os embriões e as larvas podem ser colocados em recipientes menores com as partes laterais ou extremidades em rede, de modo a permitir um fluxo da solução de ensaio através do recipiente. Uma forma de provocar o fluxo, sem turbulência, consiste em pendurar estes pequenos recipientes num «braço» que se movimente para cima e para baixo, desde que os organismos sejam mantidos sempre submersos. Poderá também utilizar-se um sistema de fluxo por efeito de sifão. Os ovos fertilizados de peixes salmonídeos podem ser colocados em suportes ou redes com orifícios suficientemente largos para permitir que as larvas saiam após a eclosão. Nos ensaios semi-estáticos com renovação diária total, a remoção dos embriões e das larvas poderá ser feita de forma apropriada utilizando pipetas Pasteur (ver ponto 1.6.6).

Quando se utilizam recipientes de ovos, grades ou redes para confinar os ovos no recipiente principal de ensaio, estas vedações devem ser removidas após a eclosão ([1]) das larvas, com excepção das redes, que devem ser mantidas para evitar que os peixes escapem. Se houver necessidade de transferir as larvas, estas não devem ser expostas ao ar e não se devem utilizar redes para soltar os peixes dos recipientes de ovos (tal precaução pode não ser necessária para algumas espécies menos frágeis, como a carpa, por exemplo). O momento adequado para efectuar esta transferência varia em função das espécies utilizadas, havendo casos em que a transferência poderá não ser necessária. Para o método semi-estático, podem ser utilizados copos ou recipientes pouco fundos e, se necessário, equipados com uma peneira de rede ligeiramente elevada acima do fundo do copo. Se o volume destes recipientes for suficiente para obedecer aos requisitos de carga, poderá não ser necessário efectuar a transferência de embriões ou larvas (ver ponto 1.7.1.2).

([1]) OECD, Paris, 1992. Test Guideline 210, «Fish, Early-life Stage Toxicity Test».

▼B

1.6.5. **Água**

Qualquer água é adequada como água de ensaio, desde que esteja em conformidade com as características químicas de uma água de diluição aceitável, como indicado no apêndice 4, e desde que a taxa de sobrevivência das espécies a ensaiar seja, nos controlos, pelo menos tão satisfatória como a descrita nos apêndices 2 e 3. A qualidade de água deve ser mantida constante durante o decorrer do ensaio. A variação do valor de pH não deverá ser superior a ± 0,5 unidades. De modo a assegurar que a água de diluição não influencie indevidamente o resultado do ensaio (por complexação da substância de ensaio, por exemplo) ou afecte de forma desfavorável o desempenho do lote de descendentes, deverão ser retiradas amostras regularmente para análise. Devem efectuar-se medições de metais pesados (por exemplo Cu, Pb, Zn, Hg, Cd e Ni), aniões e catiões principais (por exemplo Ca, Mg, Na, K, Cl e SO_4), pesticidas (por exemplo pesticidas organofosforados totais e organoclorados totais), carbono orgânico total e sólidos em suspensão, por exemplo, de três em três meses nos casos em que se sabe que a água de diluição mantém uma qualidade relativamente constante. Se se demonstrar que a qualidade da água se mantém inalterada durante, pelo menos, um ano, as determinações podem ser menos frequentes (de seis em seis meses, por exemplo).

1.6.6. **Soluções de ensaio**

As soluções de ensaio com as concentrações escolhidas são preparadas por diluição da solução de reserva.

A solução de reserva deve ser preparada, preferencialmente, apenas por mistura ou agitação da substância de ensaio na água de diluição, utilizando meios mecânicos (agitação e dispersão ultra-sónica, por exemplo). Podem ser utilizadas colunas de saturação (colunas de solubilidade) para obter uma solução de reserva concentrada adequada. Deve evitar-se, tanto quanto possível, a utilização de solventes ou dispersantes (agentes solubilizantes). No entanto, tais compostos podem ser necessários, em alguns casos, para produzir uma solução de reserva com a concentração adequada. A acetona, o etanol, o metanol, a dimetilformamida e o trietilenoglicol são exemplos de solventes adequados. Dispersantes adequados são, por exemplo, o Cremofor RH40, o Tween 80, a metilcelulose 0,01 % e o HCO-40. Deve ter-se cuidado ao utilizar agentes facilmente biodegradáveis (como a acetona, por exemplo) e/ou altamente voláteis, uma vez que estes podem causar problemas com o desenvolvimento de bactérias nos ensaios em que for utilizado o método de escoamento. Quando se utiliza um agente solubilizante, este não deve ter um efeito significativo na sobrevivência, nem um efeito adverso observável nas fases iniciais de vida, de acordo com o controlo em presença apenas do solvente. No entanto, como se referiu acima, devem fazer-se todos os esforços para evitar utilizar tais produtos.

Para o método semi-estático, podem seguir-se dois procedimentos de renovação diferentes: i) podem preparar-se novas soluções de ensaio em recipientes limpos e transferir suavemente os ovos e larvas sobreviventes para estes recipientes, num pequeno volume da solução velha e evitando a exposição ao ar, ou ii) podem manter-se os organismos a ensaiar nos recipientes enquanto uma proporção da água de ensaio (pelo menos três quartos) é mudada. A frequência de renovação do meio dependerá da estabilidade da substância de ensaio, mas recomenda-se uma renovação diária da água. Se, a partir de ensaios de estabilidade preliminares (ver ponto 1.4), se demonstrar que a concentração da substância de ensaio não é estável (isto é, se estiver fora da gama de 80-120 % do valor nominal ou for inferior a 80 % da concentração medida inicialmente) durante o período de renovação, deve considerar-se a utilização de um ensaio por escoamento. Em qualquer dos casos, deve ter-se cuidado para evitar a perturbação das larvas durante a operação de renovação da água.

▼B

Para os ensaios por escoamento, é necessário utilizar um sistema que distribua e dilua continuamente a solução de reserva da substância de ensaio (uma bomba de medição, um diluidor proporcional, um sistema saturador, por exemplo), por forma a fornecer uma série de concentrações às câmaras de ensaio. As taxas de fluxo das soluções de reserva e da água de diluição devem ser verificadas a intervalos regulares, de preferência diariamente, e não devem variar mais do que 10 % ao longo do ensaio. Considera-se adequada uma taxa de fluxo equivalente a, pelo menos, o volume de cinco câmaras de ensaio em 24 horas (2).

1.7. PROCEDIMENTO

Existem trabalhos publicados que contêm informações úteis sobre a realização de ensaios de toxicidade em embriões de peixe e peixes recém-nascidos, dos quais alguns são indicados na bibliografia apresentada no final (7), (8) e (9).

1.7.1. **Condições de exposição**

1.7.1.1. *Duração*

O ensaio deve iniciar-se de preferência 30 minutos após a fertilização dos ovos. Os embriões são imersos na solução de ensaio antes ou o mais cedo possível depois do início da fase de segmentação discoidal mas, de qualquer forma, sempre antes do início da fase de gástrula. Nos casos em que os ovos utilizados forem obtidos através de um fornecedor comercial, poderá não ser possível iniciar o ensaio imediatamente após a fertilização. O ensaio deve iniciar-se nas oito horas subsequentes à fertilização, porque qualquer atraso pode influenciar significativamente a sensibilidade. Uma vez que as larvas não são alimentadas durante o período de exposição, o ensaio deve terminar imediatamente antes que o saco vitelino de qualquer larva em qualquer das câmaras de ensaio tenha sido completamente absorvido ou antes que se registe mortalidade por falta de alimento. O tempo de exposição dependerá da espécie utilizada. Nos apêndices 2 e 3, apresentam-se algumas recomendações relativas ao período de exposição.

1.7.1.2. *Carga*

O número de ovos fertilizados no início do ensaio deverá ser suficiente para permitir o cumprimento dos requisitos estatísticos. Os ovos devem ser distribuídos aleatoriamente pelos grupos de tratamento e, pelo menos. 30 ovos fertilizados deverão ser repartidos de forma equitativa (ou da forma mais equitativa possível, uma vez que é difícil obter lotes iguais quando se utilizam algumas espécies) pelo menos por três câmaras de ensaio (repetições) para cada concentração. A taxa de carga (biomassa por volume de solução de ensaio) deve ser suficientemente pequena para permitir manter uma concentração de oxigénio dissolvido de pelo menos 60 % VSA sem arejamento. Para os ensaios por escoamento, foi recomendada uma taxa de carga que nunca deverá exceder 0,5 g/l em 24 horas, nem 5 g/l de solução (2).

1.7.1.3. *Luz e temperatura*

O fotoperíodo e a temperatura da água do ensaio devem ser apropriados para a espécie a ensaiar (apêndices 2 e 3). Poderá ser apropriado utilizar um recipiente de ensaio adicional para a monitorização da temperatura.

▼B

1.7.2. **Concentrações de ensaio**

Normalmente, deverão ser utilizadas cinco concentrações da substância de ensaio espaçadas por um factor constante não superior a 3,2. Na escolha da gama de concentrações do ensaio, deve considerar-se a curva que relaciona a CL_{50} com o período de exposição no estudo de toxicidade aguda. Nalgumas circunstâncias, poderá ser apropriado utilizar menos de cinco concentrações (em testes-limite, por exemplo) e um intervalo de concentração mais estreito. Deve fornecer-se uma justificação quando se utilizam menos de cinco concentrações. As concentrações da substância superiores ao valor CL_{50} após 96 horas ou a 100 mg/l (a mais reduzida das duas), não necessitam de ser ensaiadas. As substâncias não devem ser ensaiadas acima do seu limite de solubilidade na água de ensaio.

Quando se utiliza um agente solubilizante para facilitar a preparação de soluções de ensaio (ver ponto 1.6.6), a sua concentração final nos recipientes de ensaio não deve ser superior a 0,1 ml/l e deve ser a mesma em todos os recipientes de ensaio.

1.7.3. **Controlos**

Além dos ensaios principais, devem ser utilizados um controlo da água destilada (com as repetições apropriadas) e, se relevante, um controlo contendo o agente solubilizante (com as repetições apropriadas).

1.7.4. **Frequência das determinações analíticas e medições**

Durante o ensaio, as concentrações da substância de ensaio deverão ser determinadas a intervalos regulares.

No ensaio semi-estático, em que se espera que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro de um intervalo de ± 20 % do valor nominal (isto é, dentro da gama 80-120 %; ver ponto 1.4 e 1.6.6), recomenda-se que, no mínimo, a maior e a menor concentrações de ensaio sejam analisadas quando acabam de ser preparadas e imediatamente antes da renovação em, pelo menos, três ocasiões a intervalos regulares durante o ensaio (isto é as análises devem ser realizadas numa amostra da mesma solução — quando esta acaba de ser preparada e no momento da renovação).

Para os ensaios em que não se espera que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro do intervalo de ± 20 % do valor nominal (com base nos dados de estabilidade da substância), é necessário analisar todas as concentrações de ensaio, logo após a sua preparação e antes da renovação, mas seguindo o mesmo regime (isto é, em pelo menos três ocasiões a intervalos regulares durante o ensaio). A determinação das concentrações da substância de ensaio antes da renovação só necessita de ser realizada numa das repetições para cada concentração de ensaio. O intervalo entre as determinações não deve exceder sete dias. Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. No entanto, os resultados podem basear-se em valores nominais ou valores iniciais medidos, se existirem provas de que a concentração da substância a ensaiar na solução se manteve no intervalo de ± 20 % do valor nominal ou do valor da concentração inicial medida durante o ensaio.

Para os ensaios por escoamento, é apropriado um regime de amostragem semelhante ao descrito para os ensaios semi-estáticos (embora a medição das soluções «usadas» não seja aplicável neste caso). No entanto, se o ensaio se prolongar por mais de sete dias, poderá ser aconselhável aumentar o número de amostras analisadas durante a primeira semana (efectuando três conjuntos de medições, por exemplo) de forma a assegurar que as concentrações de ensaio se mantêm estáveis.

▼B

As amostras podem precisar de ser centrifugadas ou filtradas (utilizando um poro com 0,45 μm de tamanho, por exemplo). No entanto, como nem sempre a centrifugação ou a filtração separam a fracção não biodisponível da fracção biodisponível da substância de ensaio, as amostras poderão não ser sujeitas a estes tratamentos.

Durante o ensaio, o oxigénio dissolvido, o pH e a temperatura devem ser medidos em todos os recipientes de ensaio. A dureza total e a salinidade (se relevante) devem ser medidas nos controlos e num recipiente com a concentração mais elevada. O oxigénio dissolvido e a salinidade (se relevante) devem ser medidos, no mínimo, três vezes (no início, a meio e no fim do ensaio). Nos ensaios semi-estáticos, recomenda-se que o oxigénio dissolvido seja medido com maior frequência, de preferência antes e após cada renovação da água ou, pelo menos, uma vez por semana. O pH deve ser medido no início e no fim de cada renovação da água nos ensaios semi-estáticos e, pelo menos, semanalmente nos ensaios por escoamento. A dureza deve ser medida uma vez em cada ensaio. A temperatura deve ser medida diariamente e, de preferência, monitorizada continuamente pelo menos num recipiente de ensaio.

1.7.5. **Observações**

1.7.5.1. *Estádio de desenvolvimento embrionário*

O estádio embrionário (isto é, o estádio de gástrula) no início da exposição à substância de ensaio deve ser verificado de forma tão precisa quanto possível. Poder-se-á utilizar para o efeito uma amostra representativa dos ovos adequadamente conservados e limpos. A bibliografia apresentada no final poderá também ser consultada para a descrição e ilustração dos estádios embrionários (2), (5), (10) e (11).

1.7.5.2. *Eclosão e sobrevivência*

A eclosão e a sobrevivência deverão ser observadas e registadas, pelo menos diariamente. No início do ensaio, poderá ser útil efectuar observações mais frequentes (de 30 em 30 minutos durante as primeiras três horas, por exemplo), uma vez que, em alguns casos, o período de sobrevivência pode ser mais relevante do que apenas o número de mortes (quando existem efeitos tóxicos agudos, por exemplo). Os embriões e as larvas mortos devem ser retirados logo após a sua observação, uma vez que podem decompor-se rapidamente. A remoção dos indivíduos mortos deverá ser extremamente cuidadosa, de forma a não provocar danos físicos nos ovos/larvas vizinhos, já que estes são extremamente frágeis e sensíveis. Os critérios de morte variam de acordo com o estádio de vida:

— **para os ovos:** particularmente nos estádios iniciais, uma acentuada perda de translucidez e alteração na coloração, causada por coagulação e/ou precipitação de proteína e conduzindo a um aspecto branco opaco,

— **para os embriões:** ausência de movimento e/ou ausência de batimentos cardíacos e/ou descoloração opaca nas espécies com embriões normalmente translúcidos,

— **para as larvas:** imobilidade e/ou ausência de movimentos respiratórios e/ou ausência de batimentos cardíacos e/ou coloração branca opaca do sistema nervoso central e/ou falta de reacção a estímulos mecânicos.

▼B

1.7.5.3. *Aspecto anómalo*

O número de larvas que apresentam uma forma corporal e/ou uma pigmentação anómalos, assim como o estado de absorção do saco vitelino deverão ser registados a intervalos de tempo adequados em função da duração do ensaio e da natureza da anomalia descrita. É importante notar que o aparecimento de embriões e larvas com anomalias é um fenómeno que ocorre naturalmente, podendo nalgumas espécies afectar uma percentagem significativa do(s) controlo(s). Os animais que apresentem um aspecto anómalo só devem ser retirados dos recipientes de ensaio quando estiverem mortos.

1.7.5.4. *Comportamento anómalo*

Anomalias tais como a hiperventilação, as alterações no comportamento natatório e o estado de passividade anormal, deverão ser registadas a intervalos de tempo adequados, em função da duração do ensaio. Embora estes efeitos sejam difíceis de quantificar, a sua observação pode ajudar na interpretação dos dados relativos à mortalidade, isto é, podem fornecer informação sobre o mecanismo de acção tóxica da substância.

1.7.5.5. *Comprimento*

Recomenda-se que, no fim do ensaio, se proceda à medição do comprimento de cada indivíduo. Os comprimentos a medir poderão ser o normalizado, o comprimento até à extremidade da barbatana caudal ou o comprimento total. Se, no entanto, as barbatanas caudais dos peixes apresentarem sinais de apodrecimento ou erosão, o comprimento a medir será o normalizado. Normalmente, num ensaio bem realizado o coeficiente da variação de comprimento entre as repetições dos controlos deve ser $\leq$ 20 %.

1.7.5.6. *Peso*

No fim do ensaio, os indivíduos poderão ser pesados separadamente, sendo preferível o peso seco (24 horas a 60 ^{o}C) ao peso fresco (seco com papel absorvente). Normalmente, num ensaio bem realizado, o coeficiente de variação de peso entre as repetições dos controlos deve ser $\leq$ 20 %.

A partir destas observações, deverão ser elaborados todos ou parte dos seguintes dados, que serão objecto de análise estatística:

— mortalidade acumulada,

— números de larvas saudáveis no fim do ensaio,

— início e fim do período de eclosão (isto é 90 % de eclosão em cada repetição),

— números de larvas eclodidas por dia,

— comprimento (e peso) dos animais sobreviventes no fim do ensaio,

— números de larvas que apresentam deformações ou um aspecto anómalo,

— números de larvas que apresentam um comportamento anómalo.

▼B

2. **DADOS E RELATÓRIO**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Recomenda-se que um técnico estatístico participe tanto no planeamento como na análise do ensaio, uma vez que o método permite variações consideráveis no planeamento experimental no que se refere, por exemplo, ao número de câmaras de ensaio, ao número de concentrações de ensaio, ao número inicial de ovos fertilizados e aos parâmetros medidos. Devido às inúmeras opções disponíveis quanto ao planeamento do ensaio, não se fornece qualquer orientação específica relativamente aos procedimentos estatísticos.

Se se pretender determinar a LOEC/NOEC, será necessário analisar as variações dentro de cada conjunto de repetições, utilizando uma análise de variância (ANOVA) ou procedimentos de tabelas de contingência. O método de Dunnett (12) (13) pode ser útil para efectuar uma comparação múltipla entre os resultados das concentrações individuais e os dos controlos. Existem igualmente outros exemplos úteis (14) (15). A dimensão do efeito detectável utilizando o método ANOVA ou outros procedimentos (isto é a capacidade do ensaio) deverá ser calculada e descrita. Importa salientar que nem todas as observações descritas no ponto 1.7.5.6 são adequadas para a análise estatística utilizando a ANOVA. A mortalidade acumulada e os números de larvas saudáveis no fim do ensaio podem ser analisados utilizando métodos probit, por exemplo.

Se se pretender determinar os valores CL/CE_X, a(s) curva(s) adequada(s), como a curva logística, deve(m) ser ajustada(s) aos dados relevantes utilizando um método estatístico (como o método dos mínimos quadrados ou dos mínimos quadrados não linear). A(s) curva(s) deve(m) ser parametrizada(s) de modo a que os valores CL/CE_X de interesse e o seu desvio-padrão possam ser estimados directamente. Isto facilitará enormemente o cálculo dos limites de confiança em volta dos valores CL/CE_X. A não ser que haja boas razões para preferir limites de confiança diferentes, devem ser utilizados limites de confiança de mais ou menos 95 %. O procedimento de ajuste deve, preferencialmente, permitir avaliar a significância da falta de ajuste. Podem utilizar-se métodos gráficos de ajuste de curvas. A análise de regressão é adequada para todas as observações descritas no ponto 1.7.5.6.

2.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados devem ser interpretados com precaução quando as concentrações tóxicas medidas nas soluções de ensaio ocorrem em níveis situados perto do limite de detecção do método analítico. A interpretação dos resultados para concentrações superiores ao limite de solubilidade da substância na água deve igualmente ser efectuada com precaução.

2.3. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

2.3.1. **Substância de ensaio:**

— natureza física e propriedades físico-químicas relevantes,

— dados de identificação química, incluindo o grau de pureza e o método analítico para a quantificação das substâncias de ensaio, quando apropriado.

▼B

2.3.2. **Espécie de ensaio:**

— nome científico, estirpe, número de peixes progenitores (isto é número de fêmeas utilizadas para fornecer o número de ovos necessários ao ensaio), fonte e método de recolha dos ovos fertilizados e posterior manuseamento.

2.3.3. **Condições de ensaio:**

— o procedimento de ensaio utilizado (semi-estático ou por escoamento, período de tempo desde a fertilização até ao início do ensaio, carga, etc.),

— o(s) fotoperíodo(s),

— o planeamento do ensaio (por exemplo, o número de câmaras de ensaio e repetições, o número de embriões por repetição),

— o método de preparação das soluções de reserva e a frequência de renovação (quando utilizados, o agente solubilizante e a sua concentração devem ser indicados),

— os valores nominais das concentrações de ensaio, os valores medidos, as suas médias e os respectivos desvios-padrão nos recipientes de ensaio, o método através do qual estes foram obtidos e, se a substância de ensaio for solúvel na água em concentrações inferiores às ensaiadas, as provas de que as medições se referem às concentrações da substância de ensaio na solução,

— características da água de diluição: o pH, a dureza, a temperatura, a concentração do oxigénio dissolvido, os níveis de cloro residual (caso tenham sido medidos), o carbono orgânico total, os sólidos em suspensão, a salinidade do meio de ensaio (caso tenha sido medida) e quaisquer outras medições efectuadas,

— a qualidade da água dentro dos recipientes de ensaio: o pH, a dureza, a temperatura e a concentração do oxigénio dissolvido.

2.3.4. **Resultados:**

— resultados de qualquer estudo preliminar sobre a estabilidade da substância de ensaio,

— prova de que os controlos estão de acordo com o padrão de aceitação de sobrevivência total da espécie de ensaio (apêndices 2 e 3),

— dados sobre a mortalidade/sobrevivência nos estádios embrionário e larvar e sobre a mortalidade/sobrevivência total,

— dias até à eclosão e número de eclosões,

— dados sobre o comprimento (e peso),

— incidência e descrição de anomalias morfológicas, caso tenham sido observadas,

— incidência e descrição de efeitos comportamentais, caso tenham sido observados,

— análise estatística e tratamento de dados,

— para ensaios analisados utilizando o método ANOVA, a menor concentração com efeito observável (LOEC) a $p = 0,05$ e a concentração sem efeito observável (NOEC) para cada resposta avaliada, incluindo uma descrição dos procedimentos estatísticos utilizados e uma indicação da dimensão do efeito que pode ser detectado,

▼B

— para os ensaios analisados utilizando técnicas de regressão, a CL/CE_X e os intervalos de confiança, bem como o gráfico do modelo ajustado utilizado para o seu cálculo,

— explicação dos motivos para qualquer desvio a este método de ensaio.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 p. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life--Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 p.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-O11, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, p. 121-173.

(6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, p. 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish *(Brachydanio rerio)* Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, p. 61-71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, p. 807-821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Relatcd Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri).* J. Aquatic Toxicology, 9, p. 129-145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 p.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoe, 50, p. 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, p. 482-491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C. J., Aderna D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, p. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 p.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, p. 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology — an invitation to the comparative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252, p. 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, p. 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, *(Oryzias latipes)*. EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow *(Pimephaless promelas)* larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, p. 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 p.

(25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, p. 1-58.

Quadro 1A

Espécies de peixes recomendadas para os ensaios

Água doce
Oncorhynchus mykiss
Truta arco-íris (9) (16)
Danio rerio
Peixe-zebra (7) (17) (18)
Cyprinus caprio
Carpa (8) (19)
Oryzias latipes
Peixinho dos arrozais (20) (21)
Pimephales promelas (8) (22)

▼B

Quadro 1B

Exemplos de outras espécies que também já foram utilizadas e sobre as quais existe documentação

Água doce	Água salgada
Carassius auratus Pimpão (8)	*Menidia peninsulae* (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus (8)	*Clupea harengus* Arenque (24) (2 5)
	Gadus morhua Bacalhau (24) (25)
	Cyprinodon variegatus (23) (24) (25)

▼B

Apêndice 1

ORIENTAÇÃO SOBRE A REALIZAÇÃO DE UM ENSAIO DE TOXICIDADE EM EMBRIÕES E RECÉM-NASCIDOS DE PEIXE-ZEBRA (*BRACHYDANIO RERIO*)

INTRODUÇÃO

O peixe-zebra é originário da costa Coromandel, na Índia, onde habita em riachos de correntes rápidas. É um peixe vulgar de aquário da família das carpas, sendo possível encontrar informação acerca dos procedimentos relativos ao seu tratamento e cultura em livros de referência sobre peixes tropicais. A sua biologia e utilização na investigação piscícola foram revistas por Laale (1).

O peixe raramente excede os 45 mm em comprimento. O corpo é cilíndrico com sete a nove riscas horizontais azul-escuro prateadas. Estas riscas prolongam-se pelas barbatanas ventrais e caudais. A região posterior é verde azeitona. Os machos são mais magros do que as fêmeas. As fêmeas são mais prateadas e o seu abdómen apresenta uma forma dilatada, particularmente antes da desova.

Os peixes adultos toleram grandes variações de temperatura, pH e dureza. No entanto, devem ser criadas condições óptimas para obter peixes saudáveis que produzam ovos de boa qualidade.

Durante a desova o macho persegue e atinge a fêmea, sendo os ovos fertilizados à medida que vão sendo expelidos. Os ovos, que são transparentes e não aderentes, caem para o fundo onde podem ser comidos pelos progenitores. A desova é influenciada pela luz. Se a luz da manhã for adequada, o peixe geralmente desova nas primeiras horas a seguir ao amanhecer.

Uma fêmea pode produzir semanalmente lotes de várias centenas de ovos.

CONDIÇÕES PARA OS PEIXES PROGENITORES, A REPRODUÇÃO E AS FASES INICIAIS DE VIDA

Seleccionar um número adequado de peixes saudáveis e mantê-los numa água adequada (nas condições descritas no apêndice 4, por exemplo) durante, pelo menos, duas semanas antes da desova pretendida. Deve permitir-se que o grupo de peixes se reproduza pelo menos uma vez antes de produzir o lote de ovos utilizados no ensaio. A densidade dos peixes durante este período não deve exceder 1 grama por litro. A mudança regular da água ou a utilização de sistemas de purificação permitirão que a densidade seja mais elevada. A temperatura nos tanques de conservação deve ser mantida a 25 ± 2 °C. Deve fornecer-se aos peixes uma dieta variada, que poderá consistir, por exemplo, em alimentos comerciais secos apropriados, larvas vivas recém-eclodidas, *Artemia, chironomus, Daphnia,* ou *Enchytraeus.*

São indicados em seguida dois procedimentos que, na prática, permitiram obter um lote de ovos fertilizados saudáveis adequado à realização de um ensaio:

i) Colocam-se oito fêmeas e 16 machos num tanque contendo 50 litros de água de diluição, protegidos da luz directa e mantidos, tanto quanto possível, sem perturbações durante pelo menos 48 horas. Na tarde do dia anterior ao início do ensaio, coloca-se um tabuleiro de desova no fundo do aquário. O tabuleiro de desova consiste numa moldura de *plexi-glass* ou outro material adequado com 5 a 7 cm de altura, com uma rede grosseira de malha de 2 a 5 mm presa no topo, e uma rede fina (malha de 10 a 30 μm) no fundo. Prende-se à rede grosseira da estrutura uma série de «árvores de desova», que consistem em pedaços de corda de *nylon* desenrolada. Após o peixe ter permanecido num ambiente sem luz durante 12 horas, acende-se uma luz ténue que provocará o início da desova. Duas a quatro horas após a desova, remove-se o tabuleiro e recolhem-se os ovos. O tabuleiro de desova evitará que o peixe coma os ovos e, ao mesmo tempo, permitirá a sua fácil recolha. O grupo de peixes deverá ter desovado pelo menos uma vez antes da desova que originará os ovos a utilizar no ensaio;

▼B

ii) Cinco a dez peixes machos e fêmeas são mantidos individualmente pelo menos duas semanas antes da desova pretendida. Após cinco a dez dias, o abdómen das fêmeas estará distendido e as suas papilas genitais visíveis. Os machos não têm papila. A desova é realizada em tanques de desova equipados com um fundo falso em rede (como descrito anteriormente). Enche-se o tanque com água de diluição, de modo a que a altura da água acima da rede seja de 5 a 10 cm. Colocam-se uma fêmea e dois machos no tanque um dia antes da desova pretendida. Aumenta-se gradualmente a temperatura da água um grau acima da temperatura de aclimatização. Apaga-se a luz e o tanque é mantido com a mínima perturbação possível. De manhã, acende-se uma luz ténue que irá provocar o início da desova. Após duas a quatro horas, removem-se os peixes e recolhem-se os ovos. Se uma só fêmea não produzir lotes com número suficiente de ovos, podem preparar-se, em paralelo, tantos tanques de desova quantos os necessários. Os registos sobre o nível de reprodução individual das fêmeas antes do ensaio (tamanho do lote e qualidade) poderão servir para seleccionar as fêmeas com maior sucesso reprodutivo.

Os ovos devem ser transferidos para os recipientes de ensaio utilizando tubos de vidro (com um diâmetro interno não inferior a 4 mm) adaptados a uma ampola de sucção flexível. A quantidade de água que acompanha os ovos aquando da sua transferência deverá ser reduzida ao mínimo possível. Os ovos são mais pesados do que a água e afundam-se caindo do tubo. Deve ter-se cuidado para evitar que os ovos (e as larvas) entrem em contacto com o ar. O exame microscópico de amostra(s) do(s) lote(s) deve ser realizado para assegurar que não há irregularidades nos primeiros estádios de desenvolvimento. Não é permitida a desinfecção dos ovos.

A taxa de mortalidade dos ovos é mais elevada durante as primeiras 24 horas após a fertilização, período durante o qual se observa, geralmente, uma taxa de mortalidade de 5 a 40 %. por cento. Os ovos degeneram em consequência do insucesso da fertilização ou de alteração no desenvolvimento. A qualidade do lote de ovos parece depender do peixe fêmea, uma vez que algumas fêmeas produzem consistentemente ovos de boa qualidade, enquanto que outras nunca o fazem. As taxas de desenvolvimento e de eclosão variam igualmente de lote para lote. Os ovos fertilizados com sucesso e as larvas com saco vitelino sobrevivem bem, normalmente com taxas acima dos 90 %. A 25 ºC, os ovos eclodirão três a cinco dias após a fertilização e o saco vitelino será absorvido cerca de 13 dias após a fertilização.

O desenvolvimento embrionário foi descrito de forma muito completa por Hisaoka e Battle (2). Devido à transparência dos ovos e das larvas pós-eclosão, o desenvolvimento dos peixes pode ser seguido e a presença de malformações observada. Aproximadamente quatro horas após a desova, é possível distinguir os ovos fertilizados dos não fertilizados (3). Para efectuar este exame, os ovos e as larvas são colocados em recipientes de ensaio de pequeno volume e estudados ao microscópio.

As condições de ensaio aplicáveis às fases iniciais de vida encontram-se descritas no apêndice 2. Os valores óptimos para o pH e a dureza da água de diluição são, respectivamente, 7,8 e 250 mg $CaCO_3$/l.

CÁLCULOS E ESTATÍSTICA

Propõe-se uma abordagem em duas fases. Primeiro, são analisados estatisticamente os dados sobre a mortalidade, o desenvolvimento anómalo e o tempo de eclosão. Depois, para as concentrações em que não se detectaram efeitos adversos em quaisquer destes parâmetros, avalia-se estatisticamente o comprimento do corpo. Aconselha-se esta abordagem, uma vez que o produto tóxico pode matar selectivamente peixes menores, atrasar o tempo de eclosão e induzir malformações graves, conduzindo assim a desvios às medições de comprimento. Além disso, existirão aproximadamente o mesmo número de peixes a medir por tratamento, o que garante a validade da estatística do ensaio.

▼B

DETERMINAÇÃO DA CL_{50} E DA CE_{50}

A percentagem de ovos e de larvas sobreviventes é calculada e corrigida para a mortalidade nos controlos, de acordo com a fórmula de Abbott (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

em que

P = % sobrevivência corrigida

P' = % sobrevivência observada com a concentração de ensaio

C = % sobrevivência no controlo

Se possível, a CL_{50} deve ser determinada através de um método adequado no fim do ensaio.

Se for desejável incluir as anomalias morfológicas na estatística de CE_{50}, o trabalho de Stephan (5) poderá fornecer orientações úteis.

ESTIMATIVAS DA LOEC E NOEC

Um dos objectivos do ensaio em ovos e peixes recém-nascidos é comparar as concentrações diferentes de zero com o controlo, isto é, determinar a LOEC, pelo que deverão ser utilizados os métodos de comparação múltipla indicados nas obras de referência (6) (7) (8) (9) (10).

REFERÊNCIAS

(1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, p. 121--173.

(2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 p.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, p. 173-181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, p. 1-333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, p. 69-81.

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, p. 1096--1121.

(7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, p. 482-491.

(8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, p. 103-117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, p. 519-531.

(10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

Apêndice 2

CONDIÇÕES DE ENSAIO, DURAÇÃO E CRITÉRIO DE SOBREVIVÊNCIA PARA AS ESPÉCIES RECOMENDADAS

Espécie	Temperatura (ºC)	Salinidade (0/00)	Fotoperíodo (horas)	Duração dos estádios (dias)		Duração típica do ensaio	Taxa de sobrevivência nos controlos (mínima %)	
				Embriões	Recém-nascidos		Sucesso da eclosão	Pós-eclosão
ÁGUA DOCE								
Brachydanio rerio Pei xe-zebra	25 ± 1	—	12-16	3-5	8-10	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até cinco dias após a eclosão (8-10 dias)	80	90
Oncorhynchus mykiss Truta arco-íris	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (a)	30-35	25-30	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até 20 dias após a eclosão (50-55 dias)	66	70
Cyprinus carpio Carpa	21-25	—	12-16	5	> 4	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até quatro dias após a eclosão (8-9 dias)	80	75
Oryzias latipes Peixinho dos arrozais	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12-16	8-11	4-8	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até cinco dias após a eclosão (13-16 dias)	80	80
Pimephales promelas	25 + 2	—	16	4-5	5	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até quatro dias após a eclosão (8-9 dias)	60	70

(1) Para embriões.
(2) Para larvas.
(a) Escuridão para o embrião e as larvas até uma semana após a eclosão, excepto quando estes estão a ser inspeccionados. A partir daí, deve utilizar-se luz fraca ao longo do ensaio.

Apêndice 3

Condições de ensaio, duração e critérios de sobrevivência para outras espécies relativamente às quais existem trabalhos de referência

Espécie	Temperatura (DC)	Salinidade (0/00)	Fotoperíodo (horas)	Duração dos estádios (dias)		Duração típica do ensaio de embriões e recém-nascidos	Taxa de sobrevivência nos controlos (% mínima)	
				Embriões	Ensaio recém-nascidos		Sucesso da eclosão	Pós-eclosão
ÁGUA DOCE								
Carassius auratus Pimpão	24 ± 1	—	—	3-4	> 4	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até quatro dias após a eclosão (sete dias)	—	80
Leopomis macrochirus	21 ± 1	—	16	3	> 4	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até quatro dias após a eclosão (sete dias)	—	75
ÁGUA SALGADA								
Menidia peninsulae	22-25	15-22	12	1,5	10	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até cinco dias após a eclosão (6-7 dias)	80	60
Clupea harengus Arenque	10 ± 1	8-15	12	20-25	3-5	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até três dias após a eclosão (23-27 dias)	60	80
Gadus morhua Bacalhau	5 ± 1	5-30	12	14-16	3-5	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até três dias após a eclosão (18 dias)	60	80
Cyprinodon variegatus	25 ± 1	15-30	12	—	—	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até 4-7 dias após a eclosão (28 dias)	> 75	80

▼B

Apêndisce 4

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

Substância	Concentrações
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amónia não ionizada	< 1 μg/l
Cloro residual	< 10 μg/l
Total de pesticidas organofosforados	< 50 ng/l
Total de pesticidas organoclorados + bifenis policlorados	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

▼B

C.16. ABELHAS DOMÉSTICAS — ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL AGUDA

1. MÉTODO

O presente método de ensaio de toxicidade aguda baseia-se na publicação OECD TG 213 (1998) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente ensaio de toxicidade constitui um método laboratorial destinado a avaliar a toxicidade oral aguda de produtos fitofarmacêuticos e outras substâncias químicas para as abelhas domésticas obreiras adultas.

Os processos de avaliação e verificação das características tóxicas de substâncias podem exigir a determinação da toxicidade oral aguda para as abelhas domésticas. Esta situação verifica-se, por exemplo, quando há uma probabilidade de exposição de abelhas a um produto químico específico. O ensaio de toxicidade oral aguda permite determinar a toxicidade de pesticidas e outras substâncias químicas para as abelhas. Os seus resultados condicionarão a necessidade de efectuar ulteriores avaliações. O método é especialmente adequado para uso em programas passo-a-passo, destinados a avaliar os efeitos perigosos de pesticidas para as abelhas. Estes programas baseiam-se numa progressão sequencial de ensaios de toxicidade, que evolui de ensaios laboratoriais para experiências parcial ou totalmente realizadas no campo (1). Os pesticidas podem ser submetidos a ensaio sob a forma de substâncias activas (s.a.) ou de produtos formulados.

A sensibilidade das abelhas e o rigor do procedimento experimental devem ser verificados pela inclusão de um padrão tóxico nos ensaios.

1.2. DEFINIÇÕES

Toxicidade oral aguda: conjunto dos efeitos adversos que se manifestam num período máximo de 96 horas após a administração oral de uma dose única da substância de ensaio.

Dose: quantidade consumida da substância de ensaio. A dose é expressa em massa (μg) de substância de ensaio por animal (μg/-abelha). O facto de as abelhas serem alimentadas de forma colectiva não permite calcular a dose efectiva por cada animal. No entanto, é possível determinar a dose média (massa total de substância em ensaio consumida/número de abelhas em ensaio em cada gaiola).

DL_{50} (dose letal média) oral: dose única, calculada estatisticamente, de uma substância susceptível de causar a morte de 50 % dos animais quando administrada por via oral. O valor da DL_{50} é expresso em μg de substância de ensaio por abelha. Em ensaios de pesticidas, a substância de ensaio pode ser uma substância activa (s.a.) ou um produto formulado, que contém uma ou várias substâncias activas.

Mortalidade: um animal é considerado morto quando permanece completamente imóvel.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O método baseia-se na exposição de abelhas domésticas (Apis *mellifera)* obreiras adultas a uma gama de doses da substância de ensaio dispersa numa solução de sacarose. Após a administração das doses, as abelhas são alimentadas com a mesma solução, sem a substância de ensaio. A mortalidade das abelhas é registada diariamente, num período nunca inferior a 48 horas, sendo depois comparada com valores de controlo. Caso a taxa de mortalidade aumente entre 24 e 48 horas após a administração das doses, mantendo-se a mortalidade dos controlos num nível aceitável (ou seja, $\leq$ 10 %), o ensaio deverá ser prolongado até um máximo de 96 horas. Os resultados deverão ser analisados de forma a calcular a DL_{50} às 24 horas e às 48 horas e, em caso de prolongamento do ensaio, às 72 horas e às 96 horas.

▼B

1.4. VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio será considerado válido, desde que se verifiquem as seguintes condições:

— a mortalidade média na totalidade dos controlos no final do ensaio não deverá ser superior a 10 %,

— a DL_{50} do padrão tóxico deverá enquadrar-se na gama de concentrações especificada.

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1. **Recolha de abelhas**

O ensaio deve ser realizado com obreiras adultas jovens da mesma raça, isto é, abelhas da mesma idade, em idênticas condições de alimentação, etc. As abelhas devem provir de colónias governadas por rainhas, bem alimentadas, saudáveis, tanto quanto possível isentas de doenças e com historial e estado fisiológico conhecidos. As abelhas podem ser recolhidas na manhã do dia do ensaio ou na noite anterior, desde que permaneçam nas condições de ensaio até à realização deste. Consideram-se adequadas para o ensaio as abelhas recolhidas de favos sem postura. Devido ao facto de as abelhas sofrerem alterações fisiológicas no início da Primavera e no final do Outono, deverão evitar-se recolhas durante estes períodos. Caso seja necessário realizar ensaios nestas épocas do ano, podem usar-se abelhas eclodidas numa incubadora e alimentadas com pólen colhido da colmeia e solução de sacarose durante uma semana. As abelhas tratadas com substâncias químicas (tais como antibióticos, produtos varroacidas, etc.) não devem ser usadas em ensaios de toxicidade até quatro semanas após o final do último tratamento.

1.5.2. **Condições de alojamento e alimentação**

Devem usar-se gaiolas bem ventiladas e fáceis de limpar. As gaiolas podem ser construídas com quaisquer materiais apropriados, tais como aço inoxidável, tela de arame ou plástico. Podem ainda ser usadas gaiolas de madeira descartáveis. Por norma, cada gaiola deverá conter, de preferência, um grupo de dez abelhas. As gaiolas usadas nos ensaios devem possuir dimensões adequadas ao número de abelhas a alojar, de modo a proporcionarem espaço suficiente.

As abelhas devem ser mantidas no escuro, numa sala de ensaios, à temperatura de 25 ± 2 °C. A humidade relativa, normalmente de cerca de 50-70 %, deverá ser registada ao longo do ensaio. Os procedimentos de manipulação, incluindo o tratamento e as observações, poderão ser efectuados com iluminação (natural). As abelhas são alimentadas com uma solução aquosa de sacarose a uma concentração de 500 g/l (50 % p/v). Após a administração das doses de ensaio, as abelhas devem dispor de alimento *ad libitum*. Deve usar-se um sistema de alimentação que permita registar a quantidade de alimento consumido em cada gaiola (ver ponto 1.6.3.1). Para tal, pode utilizar-se um tubo de vidro, com cerca de 50 mm de comprimento e 10 mm de largura e a extremidade aberta estreitada para cerca de 2 mm de diâmetro.

1.5.3. **Preparação das abelhas**

As abelhas recolhidas são distribuídas aleatoriamente por gaiolas de ensaio, as quais, por sua vez, são dispostas ao acaso na sala de ensaios.

▼B

Antes do ensaio, as abelhas podem ser privadas de alimento por um período não superior a duas horas. Este tratamento é recomendável, uma vez que assegura que, no início do ensaio, todas as abelhas se encontram em idênticas condições no que respeita ao conteúdo intestinal. Antes de dar início ao ensaio, as abelhas moribundas devem ser retiradas e substituídas por abelhas saudáveis.

1.5.4. **Preparação das doses**

Caso a substância a testar seja miscível com água, poderá ser directamente dispersa numa solução de sacarose a 50 %. No caso de produtos industriais e substâncias de baixa solubilidade em água, podem usar-se outros veículos, tais como solventes orgânicos, emulsionantes ou dispersantes de baixa toxicidade para as abelhas (por exemplo, acetona, dimetilformamida, dimetilsulfóxido), A concentração do veículo depende da solubilidade da substância de ensaio, devendo ser idêntica para todas as concentrações testadas. Na generalidade dos casos, é adequado utilizar (e não ultrapassar) uma concentração de 1 %.

Devem preparar-se as soluções de controlo apropriadas, ou seja, utilizando um solvente ou dispersante para tornar a substância de ensaio solúvel. Assim, deverão ser administradas, a dois grupos de controlo distintos, duas soluções: uma em água e outra em água com sacarose, ambas contendo o solvente/veículo na mesma concentração que as soluções de dosagem.

1.6. PROCEDIMENTO

1.6.1. **Grupos de ensaio e de controlo**

O número de doses e de repetições usado no ensaio deverá satisfazer os requisitos estatísticos para a determinação das DL_{50}, com limites de confiança de 95 %. De uma forma geral, é necessário usar cinco doses em série geométrica, com um factor não superior a 2,2 e cobrindo uma gama de concentrações que abranja a DL_{50}. No entanto, o factor de diluição e o número de concentrações por dosagem deverão ser determinados em função do declive da curva de toxicidade (dose *versus* mortalidade) e tomando em consideração o método estatístico adoptado para a análise dos resultados. Um ensaio de determinação de gama de concentrações permitirá escolher as concentrações apropriadas para a dosagem.

Cada concentração a testar deve ser aplicada em, pelo menos, três grupos idênticos, cada um constituído por 10 abelhas. Além da série em ensaio, devem ser testados pelo menos três grupos de controlo, formados por 10 abelhas cada um. Devem ainda ser incluídos os grupos de controlo apropriados para os solventes/veículos usados (ver ponto 1.5.4).

1.6.2. **Padrão tóxico**

A série em ensaio deve incluir um padrão tóxico. Devem seleccionar-se pelo menos três doses deste padrão, de modo a abranger o valor previsto para a DL_{50}. Para cada dose de ensaio, devem usar-se, pelo menos, três gaiolas idênticas, cada uma contendo dez abelhas. O padrão tóxico mais vulgarmente utilizado é o dimetoato. A DL_{50} oral às 24 horas descrita para este composto situa-se na gama de 0,10 a 0,35 µg s.a./abelha (2). No entanto, podem ser usados outros padrões tóxicos, desde que existam dados suficientes para verificar a resposta prevista à dose administrada (por exemplo, paratião).

▼B

1.6.3. **Exposição**

1.6.3.1. *Administração de doses*

A cada grupo de abelhas em ensaio, devem ser administrados 100--200 µl de solução aquosa de sacarose a 50 %, contendo a substância de ensaio na concentração apropriada. No ensaio de produtos de baixa solubilidade, toxicidade ou concentração no preparado, será necessário aumentar a proporção dos mesmos na solução de sacarose e utilizar volumes superiores. Deverá controlar-se a quantidade de solução tratada, consumida por cada grupo. Uma vez consumido o alimento tratado (normalmente num período de três a quatro horas), o sistema de alimentação deve ser retirado da gaiola e substituído por outro contendo apenas solução de sacarose, a qual deverá ser fornecida então *ad líbitum*. Em alguns casos, poderá ocorrer a rejeição das doses correspondentes às concentrações mais elevadas da de ensaio, o que terá como resultado um consumo de alimento reduzido ou nulo. Após um lapso máximo de seis horas, a solução tratada que não tenha sido consumida deverá ser substituída pela solução de sacarose sem aditivos. Deve avaliar-se a quantidade da solução tratada consumida, medindo, por exemplo, o volume ou o peso da solução não consumida.

1.6.3.2. *Duração*

O ensaio deverá prolongar-se, de preferência, até 48 horas após a substituição da solução em ensaio pela solução de sacarose sem aditivos. Se, após as primeiras 24 horas, a mortalidade continuar a aumentar em mais de 10 %, o ensaio deverá ser prolongado até um máximo de 96 horas, desde que a mortalidade nos controlos não exceda 10 %.

1.6.4. **Observações**

Devem efectuar-se registos de mortalidade decorridas quatro horas, 24 horas e 48 horas após o início do ensaio (ou seja, após a administração da dose). Em caso de prolongamento do período de observação, deverão realizar-se avaliações suplementares a intervalos de 24 horas, até um máximo de 96 horas, desde que a mortalidade dos grupos de controlo não exceda 10 %.

Deverá ser determinada a quantidade de solução consumida por cada grupo. A comparação entre as taxas de consumo de solução tratada e não tratada durante o período de seis horas em que esta é fornecida aos animais poderá dar informações sobre a palatabilidade do alimento tratado.

Deverão ser objecto de registo todas as eventuais anomalias de comportamento verificadas durante o período do ensaio.

1.6.5. **Teste-limite**

Em determinadas circunstâncias (por exemplo, quando se prevê que a substância de ensaio apresente um baixo nível de toxicidade), pode efectuar-se um teste-limite, usando 100 µg s.a./abelha, de forma a certificar-se de que a DL_{50} é superior a este valor. Deve seguir-se um procedimento idêntico ao descrito acima, incluindo o uso de três grupos duplicados para a dose de ensaio, a realização dos controlos relevantes e a avaliação da quantidade de alimento tratado consumida, assim como o uso de um padrão tóxico. Se ocorrer mortalidade, deverá realizar-se um estudo completo. Todos os efeitos subletais, caso existam, deverão ser registados (ver ponto 1.6.4).

▼B

2. **DADOS E RELATÓRIO**

2.1. DADOS

Os dados devem ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo em tratamento (e para os grupos de controlo e os associados ao padrão tóxico), o número de abelhas usado e a mortalidade em cada momento de observação, bem como o número de abelhas que apresentam um comportamento anómalo. Os dados relativos à mortalidade devem ser analisados mediante métodos estatísticos adequados (por exemplo, análise probit, média móvel, teoria do binómio relativamente à probabilidade) (3) (4). Devem ser traçadas curvas dose-resposta para cada tempo de observação recomendado, procedendo-se depois ao cálculo dos respectivos declives e à determinação das doses letais médias (DL_{50}) com limites de confiança de 95 %. Podem efectuar-se correcções na mortalidade dos grupos de controlo, usando os valores de correcção de Abbott (4) (5). Nos casos em que o alimento tratado não tenha sido totalmente consumido, deverá determinar-se a dose de substância de ensaio consumida por cada grupo. A DL_{50} deverá ser expressa em µg de substância de ensaio por abelha.

2.2. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

2.2.1. **Substância de ensaio:**

— natureza física e propriedades físico-químicas relevantes (por exemplo, estabilidade na água, pressão de vapor),

— dados de identificação química, incluindo a fórmula estrutural, o grau de pureza [ou seja, no caso de pesticidas, a identidade e a concentração da(s) substância(s) activa(s)].

2.2.2. **Espécies submetidas a ensaio:**

— nome científico, estirpe, idade aproximada (em semanas), método de recolha, data da recolha,

— dados informativos sobre as colónias usadas para recolha das abelhas submetidas a ensaio, incluindo o estado de saúde, a ocorrência de doenças de adultos, eventuais tratamentos previamente aplicados, etc.

2.2.3. **Condições do ensaio:**

— temperatura e humidade relativa da sala de ensaios,

— condições de alojamento, incluindo o tipo, as dimensões e o material de construção das gaiolas,

— métodos de preparação das soluções-mãe e soluções de ensaio (em caso de utilização de um solvente não aquoso, deve indicar-se a sua natureza e a respectiva concentração),

— planeamento do ensaio, ou seja, o número de concentrações de ensaio e os respectivos valores, bem como o número de controlos; para cada concentração de ensaio e para cada controlo, deverá indicar-se o número de gaiolas em duplicado e o número de abelhas em cada uma delas,

— data do ensaio.

▼B

2.2.4. **Resultados:**

— em caso de realização de um estudo preliminar para determinação da gama de concentrações de ensaio, os respectivos resultados,

— dados não processados: mortalidade correspondente a cada dose de ensaio em cada momento de observação,

— representação gráfica das curvas dose-resposta no final do ensaio,

— valores DL_{50}. com limites de confiança de 95 %, para cada período de observação recomendado, tanto para a substância de ensaio, como para o padrão tóxico,

— tratamentos estatísticos usados para a determinação da DL_{50},

— mortalidade nos controlos,

— outros efeitos biológicos observados ou medidos, como, por exemplo, anomalias no comportamento das abelhas (incluindo rejeição da dose de ensaio), taxa de consumo de alimento em grupos tratados e em grupos não tratados,

— qualquer desvio em relação aos procedimentos aqui descritos, assim como quaisquer outras informações relevantes.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmenta! Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, p. 151--165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees *(Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, p. 119-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, p. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, p. 265-267.

▼B

C.17. ABELHAS DOMÉSTICAS — ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA POR CONTACTO

1. MÉTODO

O presente método de ensaio de toxicidade aguda baseia-se na publicação OECD TG 214 (1998) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente ensaio de toxicidade constitui um método laboratorial, destinado a avaliar a toxicidade aguda por contacto de produtos fitofarmacêuticos e outras substâncias químicas para as abelhas domésticas obreiras adultas.

Os processos de avaliação e verificação das características tóxicas de substâncias podem exigir a determinação da toxicidade aguda por contacto para as abelhas domésticas. Esta situação verifica-se, por exemplo, quando há a probabilidade de exposição de abelhas a um produto químico específico. O ensaio de toxicidade aguda por contacto permite determinar a toxicidade de pesticidas e outras substâncias químicas para as abelhas. Os seus resultados condicionarão a necessidade de efectuar ulteriores avaliações. O método é especialmente adequado para uso em programas passo-a-passo, destinados a avaliar os efeitos perigosos de pesticidas para as abelhas. Estes programas baseiam-se numa progressão sequencial de ensaios de toxicidade, que evolui de ensaios laboratoriais para experiências parcial ou totalmente realizadas no campo (1). Os pesticidas podem ser submetidos a ensaio sob a forma de substâncias activas (s.a.) ou de produtos formulados.

A sensibilidade das abelhas e o rigor do procedimento experimental devem ser verificados pela inclusão de um padrão tóxico nos ensaios.

1.2. DEFINIÇÕES

Toxicidade aguda por contacto: conjunto dos efeitos adversos que se manifestam num período máximo de 96 horas após a aplicação tópica de uma dose única de uma substância.

Dose: quantidade aplicada da substância de ensaio. O valor da dose é expresso em massa (μg) de substância de ensaio por animal (μg/abelha).

DL_{50} (dose letal média) por contacto: dose única, calculada estatisticamente, de uma substância susceptível de causar a morte de 50 % dos animais quando administrada por contacto. O valor da DL_{50} é expresso em μg de substância de ensaio por abelha. Em ensaios de pesticidas, a substância de ensaio pode ser uma substância activa (s.a) ou um produto formulado, contendo uma ou várias substâncias activas.

Mortalidade: um animal é considerado morto quando permanece completamente imóvel.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O método baseia-se na exposição de abelhas domésticas *(Apis mellifera)* obreiras adultas a uma gama de doses da substância de ensaio dissolvida num veículo adequado e aplicada directamente no tórax (em gotículas). O ensaio tem a duração de 48 horas. Caso a taxa de mortalidade aumente entre 24 e 48 horas após a aplicação das doses, mantendo-se a mortalidade dos controlos num nível aceitável (ou seja, < 10 %), o ensaio deverá ser prolongado até um máximo de 96 horas. A mortalidade das abelhas é registada diariamente e comparada com valores de controlo. Os resultados deverão ser analisados de forma a calcular a DL_{50} às 24 horas e às 48 horas e, em caso de prolongamento do ensaio, às 72 horas e às 96 horas.

▼B

1.4. VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio será considerado válido, desde que se verifiquem as seguintes condições:

— a mortalidade média na totalidade dos controlos no final do ensaio não deverá ser superior a 10 %,

— a DL_{50} do padrão tóxico deverá enquadrar-se na gama de concentrações especificada.

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1. **Recolha de abelhas**

O ensaio deve ser realizado com obreiras adultas jovens, ou seja, abelhas da mesma idade, em idênticas condições de alimentação, raça idêntica, etc. As abelhas devem provir de colónias governadas por rainhas, bem alimentadas, saudáveis, tanto quanto possível isentas de doenças e com historial e estado fisiológico conhecidos. As abelhas podem ser recolhidas na manhã do dia do ensaio ou na noite anterior, desde que se mantenham nas condições de ensaio até à sua realização. Consideram-se adequadas para o ensaio as abelhas recolhidas de favos sem postura. Devido ao facto de as abelhas sofrerem alterações fisiológicas no início da Primavera e no final do Outono, deverão evitar-se recolhas durante estes períodos. Caso seja necessário realizar ensaios nestas épocas do ano, podem usar-se abelhas eclodidas numa incubadora e alimentadas durante uma semana com pólen colhido da colmeia e solução de sacarose. As abelhas tratadas com substâncias químicas (tais como antibióticos, produtos varroacidas, etc.) não devem ser usadas para ensaios de toxicidade até quatro semanas após o final do último tratamento.

1.5.2. **Condições de alojamento e alimentação**

Devem usar-se gaiolas bem ventiladas e fáceis de limpar. As gaiolas podem ser construídas com quaisquer materiais apropriados, tais como aço inoxidável, tela de arame ou plástico. Podem ainda ser usadas gaiolas de madeira descartáveis. As gaiolas usadas nos ensaios devem possuir dimensões adequadas ao número de abelhas a alojar, de modo a proporcionarem espaço suficiente. Por norma, cada gaiola deverá conter um grupo de dez abelhas.

As abelhas devem ser mantidas no escuro, numa sala de ensaios, à temperatura de 25 ± 2 ºC. A humidade relativa, normalmente de cerca de 50-70 %, deverá ser registada ao longo do ensaio. Os procedimentos de manipulação, incluindo o tratamento e as observações, poderão ser efectuados com iluminação (natural). As abelhas são alimentadas com uma solução aquosa de sacarose a uma concentração de 500 g/l (50 % p/v), que deve ser fornecida *ad libitum* durante todo o ensaio por meio de um sistema de alimentação de abelhas. Para tal, pode utilizar-se um tubo de vidro com cerca de 50 mm de comprimento e 10 mm de largura e a extremidade aberta estreitada para cerca de 2 mm de diâmetro.

1.5.3. **Preparação das abelhas**

Para a aplicação da substância de ensaio, as abelhas recolhidas são anestesiadas, podendo usar-se dióxido de carbono ou azoto para o efeito. Deverá minimizar-se a quantidade usada e o tempo de exposição ao anestésico. Antes de dar início ao ensaio, as abelhas moribundas devem ser retiradas e substituídas por abelhas saudáveis.

1.5.4. **Preparação das doses**

A substância de ensaio deverá ser aplicada na forma de solução num veículo, ou seja, num solvente orgânico ou numa solução aquosa contendo um agente molhante. O solvente orgânico mais vulgarmente utilizado é a acetona. No entanto, podem utilizar-se outros compostos de baixa toxicidade para as abelhas, como, por exemplo, dimetilformamida ou dimetilsulfóxido. A aplicação de produtos formulados dispersos em água ou de substâncias orgânicas de elevada polaridade insolúveis em solventes orgânicos pode tornar-se mais fácil se as respectivas soluções forem preparadas numa solução diluída de um agente molhante comercial (por exemplo, Agrai, Cittowett, Lubrol, Triton ou Tween).

▼B

As soluções de controlo devem ser preparadas de forma adequada, isto é, utilizando um solvente ou dispersante para tornar a substância de ensaio solúvel. Deverão ser utilizados dois grupos de controlo distintos, um tratado com água e o outro com o solvente ou dispersante.

1.6. PROCEDIMENTO

1.6.1. **Grupos de ensaio e de controlo**

O número de doses e repetições usados no ensaio deverá satisfazer os requisitos estatísticos para a determinação da DL_{50}, com limites de confiança de 95 %. De uma forma geral, é necessário usar cinco doses em série geométrica, com um factor não superior a 2,2 e cobrindo uma gama de concentrações que abranja a DL_{50}. No entanto, o número de doses deverá ser determinado em função do declive da curva de toxicidade (dose *versus* mortalidade) e tendo em consideração o método estatístico adoptado para a análise dos resultados. Um ensaio de determinação de gama de concentrações permitirá escolher as doses apropriadas.

Cada concentração de ensaio deve ser aplicada em, pelo menos, três grupos idênticos, cada um constituído por dez abelhas.

Além da série em ensaio, devem ser testados pelo menos três grupos de controlo, cada um formado por dez abelhas. Sempre que se utilize um solvente orgânico ou um agente molhante, deverão ser incluídos três grupos de controlo adicionais para estas substâncias, constituídos por dez abelhas cada.

1.6.2. **Padrão tóxico**

A série em ensaio deve incluir um padrão tóxico. Devem seleccionar-se pelo menos três doses deste padrão, de modo a abranger o valor previsto para a DL_{50}. Para cada dose de ensaio, devem usar-se pelo menos três gaiolas, cada uma contendo dez abelhas. O padrão tóxico mais vulgarmente utilizado é o dimetoato. A DL_{50} por contacto às 24 horas descrita para este composto situa-se na gama de 0,10 a 0,30 µg s.a./abelha (2). No entanto, podem ser usados outros padrões tóxicos, desde que existam dados suficientes para verificar a resposta prevista à dose aplicada (por exemplo, paratião).

1.6.3. **Exposição**

1.6.3.1. *Administração de doses*

As abelhas anestesiadas são tratadas individualmente por aplicação tópica. As diferentes doses de ensaio e os controlos são distribuídos de forma aleatória pelas abelhas. As doses são aplicadas com o auxílio de um microaplicador no lado dorsal do tórax de cada abelha, em alíquotas de 1 µl de uma solução contendo a substância de ensaio na concentração apropriada. Caso se justifique, poderão ser usados outros volumes. Após a aplicação, as abelhas são colocadas em gaiolas de ensaio e alimentadas com soluções de sacarose.

1.6.3.2. *Duração*

O ensaio deverá durar, de preferência, 48 horas. Caso a mortalidade aumente em mais de 10 % entre 24 e 48 horas após a aplicação, o ensaio deverá ser prolongado até um máximo de 96 horas, desde que a mortalidade nos controlos não exceda 10 %.

▼B

1.6.4. **Observações**

Devem efectuar-se registos de mortalidade decorridas quatro, 24 e 48 horas após o início do ensaio. Em caso de prolongamento do período de observação, deverão realizar-se avaliações suplementares com intervalos de 24 horas, até um máximo de 96 horas, desde que a mortalidade dos grupos de controlo não exceda 10 %.

Deverão ser objecto de registo todas as eventuais anomalias de comportamento verificadas durante o período do ensaio.

1.6.5. **Teste-limite**

Em determinadas circunstâncias (por exemplo, quando se prevê que a substância de ensaio apresente um baixo nível de toxicidade), pode efectuar-se um teste-limite, usando 100 μg s.a./abelha, de forma a certificar-se de que a DL_{50} é superior a este valor. Deve seguir-se um procedimento semelhante ao descrito acima, incluindo o uso de três grupos duplicados para a dose de ensaio e a realização dos controlos relevantes, assim como o uso de um padrão tóxico. Se ocorrer mortalidade, deverá realizar-se um estudo completo. Todos os efeitos subletais, caso existam, deverão ser registados (ver ponto 1.6.4).

2. **DADOS E RELATÓRIO**

2.1. DADOS

Os dados devem ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo de tratamento (e para os grupos de controlo e os associados ao padrão tóxico), o número de abelhas usadas e a mortalidade em cada momento de observação, bem corno o número de abelhas que apresentam um comportamento anómalo. Os dados de mortalidade devem ser analisados mediante métodos estatísticos adequados (por exemplo, análise probit, média móvel, teoria do binómio relativa à probabilidade) (3) (4). Devem ser traçadas curvas dose-resposta para cada tempo de observação recomendado (ou seja, 24 horas, 48 horas e, se for relevante, 72 horas e 96 horas), procedendo-se depois ao cálculo dos respectivos declives e à determinação das doses letais médias (DL_{50}) com limites de confiança de 95 %. Podem efectuar-se correcções na mortalidade dos controlos, usando os valores de correcção de Abbott (4) (5). A DL_{50} deverá ser expressa em μg de substância de ensaio por abelha.

2.2. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

2.2.1. **Substância de ensaio:**

— natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, estabilidade na água, pressão de vapor),

— dados de identificação química, incluindo a fórmula estrutural, o grau de pureza [ou seja, no caso de pesticidas, a identidade e a concentração da(s) substância(s) activa(s)].

2.2.2. **Espécies submetidas a ensaio:**

— nome científico, raça, idade aproximada (em semanas), método de recolha, data da recolha,

— dados informativos sobre as colónias usadas para recolha das abelhas submetidas a ensaio, incluindo o estado de saúde, a ocorrência de doenças de adultos, eventuais tratamentos previamente aplicados, etc.

▼B

2.2.3. **Condições do ensaio:**

— temperatura e humidade relativa da sala de ensaios,

— condições de alojamento, incluindo o tipo, as dimensões e o material de construção das gaiolas,

— métodos de administração da substância de ensaio (indicando, por exemplo, o solvente usado como veículo, o volume aplicado da solução de ensaio e os anestésicos usados),

— planeamento do ensaio, ou seja, o número de doses de ensaio e as respectivas concentrações, bem como o número de controlos; para cada dose de ensaio e para cada controlo, deverá indicar-se o número de gaiolas em duplicado e o número de abelhas em cada uma delas,

— data do ensaio.

2.2.4. **Resultados:**

— em caso de realização de um estudo preliminar para determinação da gama de concentrações de ensaio, os respectivos resultados,

— dados não processados: mortalidade correspondente a cada concentração de ensaio em cada momento de observação,

— representação gráfica das curvas dose-resposta no final do ensaio,

— valores de DL_{50}, com limites de confiança de 95 %, para cada período de observação recomendado, tanto para a substância de ensaio, como para o padrão tóxico,

— tratamentos estatísticos usados para a determinação da DL_{50},

— mortalidade nos controlos,

— outros efeitos biológicos observados ou medidos e qualquer reacção anormal das abelhas,

— qualquer desvio em relação aos procedimentos aqui descritos, assim como quaisquer outras informações relevantes.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, p. 1 51--165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E. C, Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, p. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, p. 99-11 3.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, p. 265-267.

▼B

C.18. ADSORÇÃO/DESSORÇÃO POR RECURSO A UM MÉTODO DE EQUILÍBRIO POR LOTES DE SOLOS

1. MÉTODO

O presente método é uma reprodução do método OCDE TG 106, para a determinação da adsorção/dessorção em solos por recurso a um método de equilíbrio por lotes (2000).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método baseia-se em ensaios específicos, bem como nos resultados de um seminário (*workshop*) para a selecção de solos, com vista ao desenvolvimento de um ensaio de adsorção (1) (2) (3) (4). O método tem também em conta as directrizes em vigor a nível nacional (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Os estudos de adsorção/dessorção permitem obter informações essenciais sobre a mobilidade dos produtos químicos e sua distribuição nos diversos componentes da biosfera (edáfico, aquático e atmosférico) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). As informações recolhidas podem ser utilizadas na previsão ou estimativa, nomeadamente, da disponibilidade de uma substância química para degradação (22) (23), transformação e absorção pelos organismos vivos (24), do perfil de lixiviação pelos solos (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), da volatilidade nos solos (21) (29) (30) e da transferência da superfície de solos para águas naturais (18) (31) (32). Os dados de adsorção podem ser utilizados para fins comparativos, bem como de modelização (19) (33) (34) (35).

A distribuição de uma substância química entre o solo e uma fase aquosa constitui um processo complexo que depende de diversos factores, designadamente a natureza química da substância (12) (36) (37) (38) (39) (40), as características do solo (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) e factores climáticos tais como a pluviosidade, a temperatura, a exposição ao sol e os ventos. Deste modo, os numerosos fenómenos e mecanismos envolvidos no processo de adsorção de uma substância pelo solo não podem ser totalmente definidos por um modelo laboratorial simplificado do tipo descrito no presente método. Todavia, embora a presente contribuição não abranja todos os casos possíveis no domínio ambiental, fornece informações valiosas sobre o impacto ambiental da adsorção de uma substância.

Ver também a introdução geral.

1.2. ÂMBITO

O presente método visa determinar o comportamento de uma substância no solo em termos de adsorção/dessorção. O objectivo consiste em obter um parâmetro que possa ser utilizado para prever a partição em diversas condições ambientais; para tal, determinam-se os coeficientes de adsorção em equilíbrio de um produto químico em vários solos, em função das características destes últimos (por exemplo, teor de carbono orgânico, teor de argila, textura e pH). Devem utilizar-se diferentes tipos de solos, de modo a abranger tanto quanto possível as interacções de uma determinada substância com solos de ocorrência natural.

No presente método, a adsorção é entendida como o processo de ligação de uma substância à superfície dos solos, não se efectuando qualquer distinção entre os diversos processos de adsorção (adsorção física e química), bem como entre os processos de degradação superficial catalisada, adsorção na massa e reacção química. Não é tida em conta a adsorção em partículas coloidais (diâmetro $< 0{,}2$ μm) produzidas nos solos.

▼B

Os parâmetros referentes ao solo considerados mais importantes no contexto da adsorção são os seguintes: teor de carbono orgânico (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), teor de argila e textura dos solos (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) e pH, no caso de compostos ionizáveis (3) (4) (42). Outros parâmetros que podem apresentar um impacto na adsorção-dessorção do solo são a capacidade de permuta catiónica efectiva (ECHC), o teor de ferro amorfo e de óxidos de alumínio, em especial em solos vulcânicos e tropicais (4), bem como a superfície específica (49).

O ensaio foi concebido para avaliar a adsorção de uma substância em vários tipos de solos, com diversos teores de carbono orgânico, argila, textura e pH, sendo constituído por três fases:

Fase 1: Estudo preliminar para a determinação:

— da razão solo/solução,

— do tempo necessário para atingir o equilíbrio de adsorção, bem como da quantidade de substância teste adsorvida no estado de equilíbrio,

— da adsorção da substância em estudo na superfície dos recipientes de ensaio, bem como da estabilidade da substância durante o período de ensaio.

Fase 2: Ensaio de selecção: estuda-se a cinética de adsorção a concentração constante em cinco tipos diferentes de solos, determinando-se os coeficientes de distribuição K_d e K_{oc}.

Fase 3: Determinação das isotérmicas de adsorção de Freundlich, de modo a avaliar a influência da concentração na extensão da adsorção nos solos.

Estudo da dessorção através da respectiva cinética, bem como das isotérmicas de dessorção de Freundlich (apêndice 1).

1.3. DEFINIÇÕES E UNIDADES

Símbolo	Definição	Unidades
A_{t_i}	percentagem de adsorção no instante t_i	%
A_{eq}	percentagem de adsorção no estado de equilíbrio de adsorção	%
$m_s^{ads}(t_i)$	massa de substância em estudo adsorvida no solo no instante t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	massa de substância em estudo adsorvida no solo no intervalo de tempo At_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	massa de substância em estudo adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção	µg
m_0	massa de substância em estudo no recipiente de ensaio, no início do mesmo	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	massa de substância em estudo determinada numa alíquota (v_a^A) no instante t_j	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massa de substância em estudo na solução, no estado de equilíbrio de adsorção	µg
m_{solo}	quantidade de fase edáfica, expressa em massa seca	g

▼B

Símbolo	Definição	Unidades
C_{st}	concentração mássica da solução-mãe da substância	μg cm^{-3}
C_0	concentração mássica inicial da solução de ensaio em contacto com o solo	μg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	concentração mássica da substância na fase aquosa no instante t_i em que a análise é efectuada	μg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	teor de substância adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção	μg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	concentração mássica da substância na fase aquosa no estado de equilíbrio de adsorção	μg cm^{-3}
V_0	volume inicial da fase aquosa em contacto com o solo durante o ensaio de adsorção	cm^3
v_a^A	volume da alíquota em que se determina a substância de ensaio	cm^3
	coeficiente de distribuição da adsorção	cm^3 g^{-1}
	coeficiente de adsorção normalizado relativo ao carbono orgânico	cm^3 g^{-1}
	coeficiente de adsorção normalizado da matéria orgânica	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	coeficiente de adsorção de Freundlich	μg^{-1}
l/n	expoente de Freundlich	
D_{t_i}	percentagem de dessorção no instante t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	percentagem de dessorção no intervalo Δt_i	%
K_{des}	coeficiente de dessorção aparente	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	coeficiente de dessorção de Freundlich	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{ads}(t_i)$	massa de substância de ensaio dessorvida do solo no instante t_i	μg
$m_m^{ads}(\Delta t_i)$	massa de substância de ensaio dessorvida do solo no intervalo Δt_j	μg
$m_m^{ads}(eq)$	massa de substância determinada analiticamente na fase aquosa no estado de equilíbrio de dessorção	μg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massa total de substância em estudo no estado de equilíbrio de dessorção	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	massa de substância que permanece adsorvida no solo após o intervalo At_i	μg
m_{aq}^A	massa de substância remanescente do equilíbrio de adsorção devido a uma substituição incompleta de volumes	μg
$C_s^{ads}(eq)$	teor de substância em estudo que permanece adsorvida no solo no estado de equilíbrio de dessorção	μg g^{-1}

▼B

Símbolo	Definição	Unidades
()	concentração mássica de substância de ensaio na fase aquosa no estado de equilíbrio de dessorção	µg cm^3
V_T	volume total da fase aquosa em contacto com o solo durante o ensaio de cinética de dessorção efectuado pelo método sequencial	cm^3
	volume de sobrenadante removido do tubo após atingir o estado de equilíbrio de adsorção e substituído por igual volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M	cm^3
v_a^D	volume da alíquota recolhida para fins analíticos a partir do instante (i), durante o ensaio de cinética de dessorção efectuado pelo método sequencial	cm^3
V_r^r	volume de solução recolhida do tubo (i) para a determinação da substância em estudo, no ensaio de cinética de dessorção (método paralelo)	cm^3
V_r^F	volume de solução recolhida do tubo para a determinação da substância em estudo, no estado de equilíbrio de dessorção	cm^3
MB	balanço de massas	%
m_E	massa total de substância em estudo extraída do solo e das paredes do recipiente de ensaio em duas etapas	µg
V_{rec}	volume de sobrenadante recolhido após atingir o estado de equilíbrio de adsorção	cm^3
P_{ow}	coeficiente de partição octanol/água	
pKa	constante de dissociação	
S_w	solubilidade em água	g l^{-1}

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Adicionam-se a amostras de solos de massa seca conhecida, previamente equilibradas com $CaCl_2$, 0,01 M, volumes conhecidos de soluções da substância em estudo em $CaCl_2$, 0,01 M, de concentração conhecida, marcadas ou não com radioisótopos. A mistura é agitada durante um período adequado. As suspensões de solo são separadas por centrifugação e eventualmente filtradas, procedendo-se à análise da fase aquosa. A quantidade de substância em estudo adsorvida pela amostra de solo é calculada na forma de diferença entre a quantidade de substância inicialmente presente na solução e a quantidade remanescente no final do ensaio (método indirecto).

Como alternativa, pode determinar-se directamente a quantidade de substância em estudo adsorvida, mediante a análise do solo (método directo). Este processo, que implica a extracção do solo, por etapas, com solventes adequados, é recomendado nos casos em que não possa determinar-se com rigor a diferença das concentrações da substância na solução. A adsorção da substância na superfície dos recipientes de ensaio, a instabilidade da substância no período de ensaio, bem como uma adsorção fraca que determine apenas alterações ligeiras da concentração da solução ou uma forte adsorção que origine concentrações demasiado reduzidas para serem determinadas com rigor, constituem exemplos de tais casos. Se se utilizarem substâncias marcadas com radioisótopos, pode evitar-se a extracção do solo mediante a análise da fase edáfica por combustão seguida de contagem com um contador de cintilação líquida. Trata-se, todavia, de uma técnica não específica, que não permite distinguir as substâncias iniciais dos produtos de transformação, pelo que deve ser utilizada apenas se a substância em estudo for estável no período de duração do ensaio.

▼B

1.5. INFORMAÇÕES RELATIVAS À SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

Os reagentes devem ser de qualidade analítica. No caso de substâncias em estudo de composição conhecida não marcadas, recomenda-se um grau de pureza mínimo de 95 %; no caso de substâncias marcadas com radioisótopos, a pureza deve ser de grau radioquímico. Se os isótopos radioactivos possuírem uma meia vida reduzida, devem utilizar-se parâmetros de correcção.

Antes de efectuar um ensaio de adsorção-dessorção, devem conhecer-se as seguintes informações relativas à substância em estudo:

a) Solubilidade em água (A.6);

b) Pressão de vapor (A.4) e/ou constante da lei de Henry;

c) Degradação abiótica: hidrólise em função do pH (C.7);

d) Coeficiente de partição (A.8);

e) Biodegradabilidade fácil (C.4) ou transformação aeróbia/-anaeróbia no solo;

f) pKa das substâncias ionizáveis presentes;

g) Fotólise directa em água (por exemplo, espectro de absorção UV-Vis em água, rendimento quântico) e fotodegradação no solo.

1.6. APLICABILIDADE DO ENSAIO

O ensaio é aplicável a substâncias químicas para as quais existe um método analítico suficientemente rigoroso. A estabilidade da substância no período de ensaio é um parâmetro susceptível de influenciar a fiabilidade dos resultados, em especial quando se utiliza o método indirecto. Deve, pois, efectuar-se um ensaio preliminar com o objectivo de verificar a estabilidade; caso ocorra uma transformação no período de ensaio, recomenda-se a análise do solo e das fases aquosas no ensaio principal.

Podem surgir dificuldades na condução do ensaio em substâncias de solubilidade reduzida em água ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), bem como em substâncias com carga eléctrica elevada, pode determinar dificuldades, uma vez que a determinação analítica da concentração da fase aquosa não pode ser efectuada com rigor suficiente. Nestes casos, é necessário adoptar medidas adicionais. Nas secções relevantes do presente método fornecem-se orientações para a resolução dos problemas em causa.

Caso se utilizem substâncias voláteis, devem evitar-se perdas durante o processo.

1.7. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.7.1. **Equipamento e reagentes**

Equipamento corrente de laboratório, nomeadamente:

a) Tubos ou recipientes de ensaio, que devem possuir as seguintes características:

— ser directamente adaptáveis à centrifugadora. de modo a minimizar os erros de manipulação e transferência,

— ser feitos de um material inerte, de modo a minimizar a adsorção da substância em estudo na sua superfície;

▼B

b) Dispositivo de agitação: agitador vertical ou equipamento equivalente; o dispositivo de agitação deve manter a amostra de solo em suspensão durante o processo;

c) Centrifugadora: preferentemente de alta velocidade (por exemplo, força centrífuga > 3 000 g), com controlo de temperatura e capacidade de remover da solução aquosa partículas de diâmetro superior a 0,2 μm. Os tubos ou recipientes devem ser tapados durante a agitação e centrifugação, de modo a evitar perdas por volatilização ou perdas de água; com vista a minimizar a adsorção nos tubos ou recipientes, devem utilizar-se tampas activadas, nomeadamente de teflon;

d) Dispositivo de filtração (opcional): filtros com poros de 0,2 μm, esterilizados e descartáveis. Devem adoptar-se precauções especiais na selecção dos materiais de filtração, de modo a evitar perdas da substância em estudo; no caso de substâncias pouco solúveis, não é recomendável o uso de filtros de matérias orgânicas;

e) Equipamento analítico adequado à determinação da concentração da substância em estudo;

f) Estufa com possibilidade de manter a temperatura entre 103 ºC e 110 ºC.

1.7.2. **Caracterização e selecção dos solos**

Os solos devem ser caracterizados pelos três principais parâmetros considerados responsáveis pela capacidade de adsorção: teor de carbono orgânico, teor de argila, textura do solo e pH. Como referido *supra* (Âmbito), devem ter-se em conta quaisquer outras propriedades físico-químicas do solo que possam apresentar impacto na adsorção/dessorção de uma determinada substância.

Os métodos utilizados para a caracterização dos solos são bastante importantes, podendo influenciar os resultados de modo significativo. Deste modo, recomenda-se a determinação do pH do solo numa solução de $CaCl_2$, 0,01 M (solução utilizada no ensaio de adsorção/-dessorção) de acordo com o método ISO correspondente (ISO--10390-1). Recomenda-se também a determinação de outras propriedades importantes do solo por recurso a métodos normalizados (por exemplo manual ISO de análise dos solos «Handbook of Soil Analysis»); a análise dos dados de adsorção/dessorção poderá assim basear-se em parâmetros globalmente normalizados. As referências (50-52) fornecem algumas directrizes referentes aos métodos normalizados existentes para a análise e caracterização dos solos. No que respeita à calibração dos métodos de ensaio aplicáveis aos solos, recomenda-se o uso de amostras de solos de referência.

O quadro 1 fornece directrizes para a selecção dos solos a utilizar nos ensaios de adsorção/dessorção. Os sete tipos de solos seleccionados são característicos das regiões temperadas. No caso da utilização de substâncias ionizáveis, os solos seleccionados devem possuir uma gama alargada de pH, de modo a que possa avaliar-se a adsorção da substância nas suas formas ionizada e não ionizada. Na secção 1.9 (Realização do ensaio) apresentam-se orientações relativas ao número de solos diferentes que devem ser utilizados nas várias fases do ensaio.

Caso se utilizem outros tipos de solos, estes últimos devem ser caracterizados pelos mesmos parâmetros, devendo as suas propriedades apresentar uma variação semelhante à dos solos descritos no quadro 1, mesmo que não satisfaçam os critérios de forma rigorosa.

▼B

Quadro 1

Directrizes para a selecção das amostras de solos a utilizar nos ensaios de adsorção-dessorção

Tipo de solo	Gama de pH (em $CaCl_2$ 0,01 M)	Teor de carbono orgânico (%)	Teor de argila (%)	Textura (1)
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65-80	argilosa
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20-40	argilo-limosa
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15-25	franco-limosa
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15-30	limosa
5	< 4,0 - 6,0 (2)	< 0,5 - 1,5 (2) (3)	< 10-15 (2)	limo-arenosa
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 (2) (3)	40-65	argilo-limosa/argilosa
7	< 4,5	> 10	< 10	arenosa/limo-arenosa

(1) Em conformidade com o sistema da FAO e dos Estados Unidos (85).
(2) As variáveis respectivas devem, preferencialmente, exibir valores incluídos nas gamas indicadas. Todavia, caso se observem dificuldades em encontrar solos adequados, podem utilizar-se valores inferiores aos mínimos indicados.
(3) A utilização de solos com teor de carbono orgânico inferior a 0,3 % poderá perturbar a correlação entre o referido teor e a adsorção. Recomenda-se, pois, a utilização de solos com um teor mínimo de carbono orgânico de 0,3 %.

1.7.3. **Recolha e armazenagem das amostras de solos**

1.7.3.1. *Recolha*

Não se recomendam técnicas ou instrumentos específicos de amostragem; a técnica a utilizar depende do objectivo do ensaio (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Deve ter-se em conta o seguinte:

a) São necessárias informações pormenorizadas sobre a história do local de recolha, nomeadamente a localização, o tipo de vegetação presente, o eventual tratamento com pesticidas e/ou adubos, a adição de matéria biológica e a contaminação acidental. No que respeita à descrição do referido local, devem seguir-se as recomendações da norma ISO relativa à recolha de amostras de solos (ISO 10381-6);

b) O local de recolha das amostras deve ser definido por UTM (Universal *Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum)* ou por coordenadas geográficas; o que permitirá a recolha futura de tipos específicos de solos ou contribuir para a definição dos solos em diversos sistemas de classificação utilizados em países diferentes. As amostras devem ser recolhidas apenas em horizontes A, até uma profundidade máxima de 20 cm. Se, no caso particular do solo n.º 7, se encontrar presente uma componente de horizonte O_h, a mesma deve ser incluída na amostragem.

As amostras de solo devem ser transportadas em recipientes e a temperaturas tais que as suas propriedades não sofram alterações significativas.

▼B

1.7.3.2. *Armazenagem*

É preferível a utilização de solos recentemente recolhidos. Nos casos em que tal não for possível, os solos podem ser armazenados à temperatura ambiente, numa atmosfera seca. Não se recomenda qualquer período-limite de armazenagem; contudo, no caso dos solos armazenados há mais de três anos, deve determinar-se o teor de carbono orgânico, o pH e CEC antes da utilização.

1.7.3.3. *Manuseamento das amostras de solos e sua preparação para o ensaio*

Os solos são mantidos numa atmosfera seca, à temperatura ambiente (de preferência, entre 20 e 25 ºC). Devem aplicar-se forças de desagregação mínimas, de modo a manter tanto quanto possível a textura original dos solos. Os solos são crivados a uma granulometria inferior ou igual a 2 mm; o processo de crivagem deve ser conforme às recomendações da norma ISO relativa à recolha de amostras de solos (ISO 10381-6). Recomenda-se uma homogeneização cuidadosa, de modo a aumentar a reprodutibilidade dos resultados. O teor de humidade dos solos é determinado com três alíquotas, por aquecimento a 105 ºC até não se observarem alterações de massa significativas (cerca de 12 h). Para efeitos de cálculo, utiliza-se a massa de solo seco na estufa, isto é a massa corrigida do teor de humidade.

1.7.4. **Preparação da substância em estudo para aplicação no solo**

A substância é dissolvida numa solução de $CaCl_2$, 0,01 M em água destilada ou desionizada; a solução de $CaCl_2$ é utilizada como fase aquosa com o objectivo de melhorar a centrifugação e minimizar a permuta catiónica. De preferência, a concentração da solução-mãe deve ser três ordens de grandeza acima do limite de detecção do método analítico utilizado. Este limiar garante o rigor das determinações no âmbito da metodologia do presente método; além disso, a concentração da solução-mãe deve ser inferior à solubilidade da substância em estudo em água.

A solução-mãe deve ser preparada, preferencialmente, imediatamente antes da aplicação nas amostras de solos, devendo ser mantida fechada e na ausência de luz, a 4 ºC. O tempo de armazenagem depende da estabilidade da substância e da sua concentração na solução.

No caso de substâncias pouco solúveis ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), pode ser necessário utilizar um agente de solubilização adequado. Este último: a) deve ser miscível com a água (por exemplo, metanol ou acetonitrilo); b) a sua concentração não deve exceder 1 % do volume total da solução-mãe e deve ser inferior à concentração da substância de ensaio em contacto com o solo (de preferência menos de 0,1 %); c) não deve ser tensioactivo nem susceptível de participar em processos de solvólise com a substância em estudo. A utilização de um agente de solubilização deve ser justificada de modo pormenorizado no relatório de ensaio.

A dopagem por adição da substância em estudo constitui outra alternativa aplicável a substâncias pouco solúveis. Neste caso, a substância em estudo é dissolvida num solvente orgânico, sendo adicionada uma alíquota ao sistema constituído pelo solo e a solução de $CaCl_2$ 0,01 M em água destilada ou desionizada. O teor de solvente orgânico na fase aquosa deverá ser mantido a níveis tão reduzidos quanto possível, não devendo, em geral, exceder 0,1 %. A técnica em causa tem como desvantagem a não reprodutibilidade dos volumes: o facto de a concentração da substância em estudo e do co-solvente não ser idêntica em todos os ensaios poderá representar um factor de erro adicional.

▼B

1.8. REQUISITOS PRÉVIOS PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE ADSORÇÃO/DESSORÇÃO

1.8.1. **Método analítico**

Os principais parâmetros que podem influenciar o rigor das determinações de adsorção/dessorção incluem a precisão do método de análise da solução e da fase adsorvida, a estabilidade e pureza da substância em estudo, o tempo necessário para atingir o equilíbrio de adsorção/dessorção, a amplitude da variação de concentração da solução, a razão solo/solução e as alterações na estrutura do solo durante o processo de equilíbrio (35) (59-62). O apêndice 2 fornece alguns exemplos ligados à precisão das determinações.

Deve verificar-se a fiabilidade do método analítico para a gama de concentrações susceptíveis de ocorrer durante o ensaio. O experimentador deve ser livre de desenvolver um método com exactidão, precisão, reprodutibilidade, limites de detecção e recuperação adequados. A descrição infra fornece directrizes sobre o modo de execução do ensaio em causa.

Agita-se um volume adequado (por exemplo, 100 cm^3) de $CaCl_2$ 0,01 M, durante quatro horas, com uma massa de solo (por exemplo, 20 g) de elevada capacidade de adsorção, isto é, com um teor elevado de carbono orgânico e de argila. As massas e volumes referidos podem variar em função das necessidades analíticas; uma razão solo/solução de 1:5 constitui, em geral, um valor inicial adequado. A mistura é centrifugada, podendo filtrar-se a fase aquosa. Adiciona-se à mistura um determinado volume de solução-mãe da substância em estudo, de modo a obter uma concentração nominal incluída na gama de concentrações susceptíveis de ocorrer durante o ensaio. O referido volume não deverá exceder 10 % do volume final da fase aquosa, de modo a alterar tão pouco quanto possível a natureza da solução de pré-equilíbrio. Procede-se à análise da solução.

Deve efectuar-se um ensaio em branco com o sistema constituído pelo solo e a solução de $CaCl_2$ (suprimindo a substância em estudo), de modo a averiguar a existência de anomalias no método analítico, bem como possíveis efeitos matriciais causados pelo solo.

Os métodos analíticos que podem ser utilizados para as determinações de adsorção/dessorção incluem a cromatografia gás-líquido (GLC), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a espectrometria (espectrometria de massa acoplada à GLC e HPLC) e a contagem por cintilação líquida (no caso de substâncias marcadas com radioisótopos). Independentemente do método analítico utilizado, considera-se que o mesmo é adequado se as recuperações forem da ordem de 90 % a 110 % do valor nominal. De modo a permitir efectuar a detecção e avaliação após a partição, os limites de detecção do método analítico devem ser inferiores à concentração nominal em, pelo menos, duas ordens de grandeza.

As características e limites de detecção do método analítico utilizado nos estudos de adsorção desempenham um papel importante na definição das condições de ensaio e no desempenho global do mesmo. O presente método constitui uma abordagem experimental, fornecendo recomendações e directrizes para o desenvolvimento de soluções alternativas caso o método analítico e as condições laboratoriais imponham limitações.

▼B

1.8.2. **Selecção das razões solo/solução adequadas**

A selecção das razões solo/solução adequadas aos estudos de adsorção/dessorção depende do coeficiente de distribuição K_d e do grau de adsorção relativa pretendido. A alteração da concentração da substância na solução determina o rigor estatístico da determinação, baseado na forma da equação de adsorção e do limite da metodologia analítica. Na prática, é conveniente adoptar uma série de razões fixas, relativamente às quais a percentagem adsorvida seja superior a 20 % e, preferentemente, a 50 % (62), devendo procurar manter-se a concentração da substância em estudo na fase aquosa a níveis que possam ser determinados com rigor. Tal facto é particularmente importante no caso de se observarem percentagens de adsorção elevadas.

A estimativa do valor de K_d, quer através de estudos preliminares quer por técnicas de estimativa consagradas (apêndice 3). fornece uma abordagem conveniente da selecção das razões solo/água adequadas. A selecção de uma razão pode ser efectuada com base numa representação das razões solo/solução em função dos valores de K_d, para percentagens fixas de adsorção (figura 1), presumindo a linearidade da equação de adsorção ([1]). A relação aplicável é obtida através do rearranjo da equação (4), de modo a obter a equação (1):

$$\frac{V_0}{m_{solo}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad [1]$$

ou, na forma logarítmica, assumíndo que $R = m_{solo}/V_0$ c A_{eq} %/100 $= \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)}\right] \qquad [2]$$

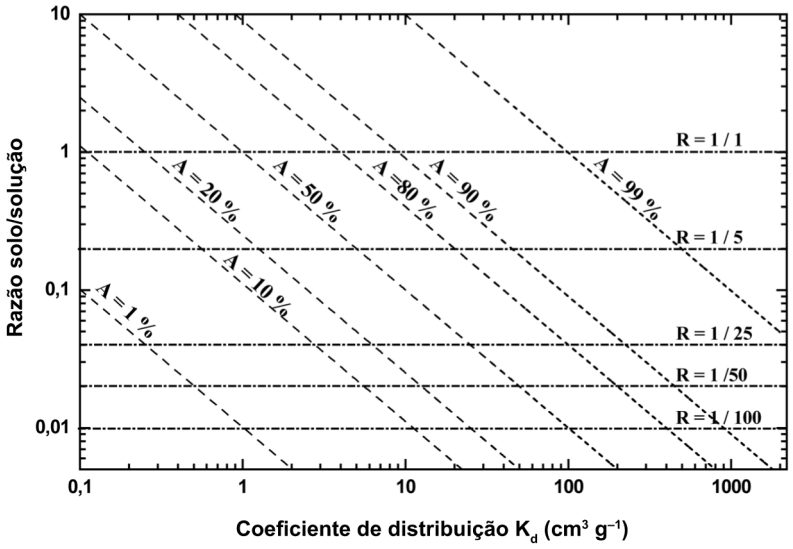


Figura 1. Relação entre as razões solo/solução e K_d, para diferentes percentagens de substância em estudo adsorvida

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

A figura 1 apresenta as razões solo/solução necessárias em função de K_d, para diversos níveis de adsorção. Por exemplo, com uma razão solo/solução de 1:5 e um K_d de 20, a percentagem de adsorção será da ordem de 80 %. Para obter uma percentagem de adsorção de 50 %, com um idêntico valor de K_d, deve utilizar-se uma razão de 1:25. Esta abordagem de selecção das razões solo/solução adequadas fornece ao investigador a flexibilidade necessária à satisfação das exigências experimentais.

As zonas de abordagem analítica mais difícil são aquelas em que a substância apresenta uma adsorção ligeira ou bastante elevada. Em caso de adsorção reduzida, recomenda-se a utilização de uma razão solo/solução de 1:1, embora, para solos com elevado teor de matéria orgânica, possa revelar-se necessário utilizar razões inferiores, de modo a obter uma massa pastosa. Devem adoptar-se precauções com a metodologia analítica para a determinação de pequenas alterações de concentração, sem o que o cálculo da adsorção será inexacto. Por outro lado, no caso de coeficientes de partição K_d bastante elevados, pode utilizar-se uma razão solo/solução de 1:100, de modo a que permaneça na solução uma quantidade apreciável da substância. Contudo, devem adoptar-se precauções no sentido de assegurar uma homogeneização adequada, devendo prever-se o tempo necessário ao equilíbrio do sistema. A previsão do valor de K_d por recurso a técnicas de estimativa baseadas, por exemplo, nos valores de P_{ow} (apêndice 3) constitui uma abordagem alternativa, que pode ser utilizada, nomeadamente, no caso de substâncias polares ou com adsorção reduzida, bem como com valores de P_{ow} inferiores a 20, e no caso de substâncias lipófilas/ou de elevada adsorção com $P_{ow} > 10^4$.

1.9. REALIZAÇÃO DO ENSAIO

1.9.1. **Condições de ensaio**

Todos os ensaios devem ser realizados à temperatura ambiente e, se possível, a uma temperatura constante compreendida entre 20 ºC e 25 ºC.

As condições de centrifugação devem permitir remover da solução partículas de granulometria superior a 0,2 μm. Este valor representa a granulometria mínima para que uma partícula seja considerada sólida, constituindo o limite entre as partículas sólidas e coloidais. O apêndice 4 fornece directrizes para a determinação das condições de centrifugação.

Se o equipamento de centrifugação não garantir a remoção de partículas de granulometria superior a 0,2 μm, pode combinar-se a centrifugação com uma filtração com filtros de 0,2 um de porosidade. Os filtros devem ser feitos de um material inerte adequado, de modo a evitar quaisquer perdas da substância em estudo. Em qualquer caso, deve provar-se a não ocorrência de perdas da substância durante a filtração.

1.9.2. **Etapa 1 — Ensaio preliminar**

O objectivo da realização de um ensaio preliminar foi já referido na secção «Âmbito». Fornecem-se de seguida directrizes para o estabelecimento das condições do referido ensaio.

1.9.2.1. *Selecção das razões solo/solução adequadas*

Utilizam-se dois tipos de solos e três razões solo/solução (seis ensaios). Um dos tipos de solos deverá possuir um teor elevado de carbono orgânico e um teor reduzido de argila; o outro solo deverá possuir um teor reduzido de carbono orgânico e um elevado teor de argila. Recomendam-se as seguintes razões:

— 50 g de solo e 50 cm^3 de solução aquosa da substância em estudo (razão 1/1),

▼B

— 10 g de solo e 50 cm^3 de solução aquosa da substância em estudo (razão 1/5),

— 2 g de solo e 50 cm^3 de solução aquosa da substância em estudo (razão 1/25).

A quantidade mínima de solo necessária para efectuar o ensaio depende das condições laboratoriais e do desempenho dos métodos analíticos utilizados. Recomenda-se, contudo, a utilização de, pelo menos, 1 g, e, de preferência, 2 g, de modo a obter resultados fiáveis.

Uma amostra de controlo, contendo a substância em estudo dissolvida na solução de $CaCl_2$ 0,01 M, na ausência de solo, é sujeita ao mesmo tratamento que os sistemas de ensaio, com o objectivo de verificar a estabilidade da substância em estudo na solução de $CaCl_2$, bem como a sua eventual adsorção na superfície dos recipientes de ensaio.

Deve efectuar-se um ensaio em branco para cada tipo de solo, aplicando um procedimento idêntico a uma amostra constituída pela mesma quantidade de solo e um volume total de 50 cm^3 de solução de $CaCl_2$ 0,01 M, na ausência da substância em estudo. O ensaio em branco possui uma função de controlo do processo analítico, permitindo detectar a presença de substâncias interferentes ou de contaminantes dos solos.

Todos os ensaios, incluindo os de controlo e brancos, devem ser realizados pelo menos em duplicado. O número total de amostras a preparar para o ensaio pode ser calculado em função da metodologia utilizada.

Os métodos utilizados no ensaio preliminar e no ensaio principal são, de modo geral, idênticos, referindo-se as excepções sempre que for caso disso.

Antes da realização do ensaio, as amostras de solos secas ao ar são equilibradas por agitação, durante 12 h, com um volume mínimo de 45 cm^3 de $CaCl_2$ 0,01 M. Seguidamente, adiciona-se um volume determinado de solução-mãe da substância em estudo, de modo a ajustar o volume final para 50 cm^3. O volume de solução-mãe a adicionar: a) não deve exceder 10 % do volume final (50 cm^3) da fase aquosa, de modo a alterar tão pouco quanto possível a natureza da solução de pré-equilíbrio: b) deve, de preferência, resultar numa concentração inicial da substância em estudo em contacto com o solo (C_0) superior ao limite de detecção do método analítico em, pelo menos, duas ordens de grandeza; este limiar garante a possibilidade de efectuar determinações rigorosas mesmo em caso de ocorrência de uma forte adsorção (> 90 %), bem corno o cálculo posterior das isotérmicas de adsorção. Recomenda-se também, na medida do possível, que a concentração inicial da substância em estudo (C_0) não exceda metade do seu limite de solubilidade.

Apresenta-se de seguida um exemplo do cálculo da concentração da solução-mãe (C_{st}). Assume-se que o limite de detecção é de 0,01 μg cm^{-3} e a taxa de adsorção de 90 %; nestas condições, a concentração inicial da substância em estudo em contacto com o solo deve, preferentemente, ser de 1 μg cm^{-3} (superior ao limite de detecção em duas ordens de grandeza). Supondo que se adiciona o volume máximo recomendável de solução-mãe, isto é, 5 a 45 cm^3 de solução de $CaCl_2$ 0,01 M (= 10 % de solução-mãe a um volume total da fase aquosa de 50 cm^3), a concentração da solução-mãe deve ser de 10 μg cm^{-3}, ou seja, superior ao limite de detecção do método analítico em três ordens de grandeza.

Deve determinar-se o pH da fase aquosa antes e após o contacto com o solo. uma vez que desempenha um papel importante em todo o processo de adsorção, especialmente no caso das substâncias ionizáveis.

▼B

A mistura é agitada até ser atingido o equilíbrio de adsorção. O tempo necessário para atingir o equilíbrio no solo é bastante variável, dependendo da natureza da substância e do tipo de solo; um período de 24 h é, em geral, suficiente (77). No estudo preliminar, recomenda-se a adopção de uma amostragem sequencial nas 48 h subsequentes à mistura (por exemplo, após quatro, oito, 24 e 48 h). Deve, contudo, adoptar-se uma relativa flexibilidade no que respeita à duração do ensaio, tendo em conta a programação do trabalho de laboratório.

Existem duas opções para a análise da substância em estudo na solução aquosa: a) método paralelo b) método sequencial. Deve sublinhar-se que, embora no plano experimental o método paralelo seja mais fastidioso, o tratamento matemático dos resultados é mais simples (ver apêndice 5). Todavia, a escolha da metodologia a adoptar é deixada ao critério do experimentador, que deverá ter em conta as condições e os recursos laboratoriais disponíveis.

a) Método paralelo: preparam-se amostras com a mesma razão solo/-solução, em número igual aos intervalos de tempo em que pretende estudar-se a cinética de adsorção. Após centrifugação e, se necessário, filtração, a fase aquosa do primeiro tubo é recolhida tão completamente quanto possível e sujeita a análise após, por exemplo, quatro h, sendo a fase aquosa do segundo tubo recolhida após oito h, a do terceiro tubo após 24, etc.;

b) Método sequencial: prepara-se uma única amostra em duplicado por cada razão solo/solução. A mistura é centrifugada a intervalos regulares, de modo a separar as fases. Determina-se de imediato a substância em estudo numa pequena alíquota da fase aquosa, prosseguindo-se o ensaio com a mistura original. Caso se recorra à filtração após a centrifugação, as condições do laboratório devem permitir filtrar alíquotas aquosas de volume reduzido. Recomenda-se que o volume total de alíquotas recolhidas não exceda 1 % do volume total da solução, de modo a não alterar significativamente a razão solo/solução e reduzir a massa de soluto disponível para adsorção durante o ensaio.

Calcula-se a percentagem de adsorção A_{t_i} em cada instante (t_i) com base na concentração inicial nominal e na concentração determinada no instante de amostragem (t_j), corrigida do valor referente à amostra em branco. A representação gráfica A, em função! do tempo (figura 1 do apêndice 5) permite obter uma estimativa do tempo necessário para atingir o patamar de equilíbrio ([1]), bem como calcular o valor de K_d no estado de equilíbrio. Com base no valor de K_d, seleccionam-se da figura l razões solo/solução adequadas, que determinem uma percentagem de adsorção superior a 20 % e, preferentemente, superior a 50 % (61). As equações a aplicar e princípios de representação gráfica são fornecidos na secção «Apresentação dos resultados» e no apêndice 5.

1.9.2.2. *Determinação do tempo necessário para atingir o equilíbrio de adsorção e da quantidade de substância em estudo adsorvida no estado de equilíbrio*

Como referido *supra*, a representação gráfica de A_{t_i} ou $\left(C_{aq}^{ads}\right)$ em função do tempo permite obter uma estimativa do instante em que é atingido o equilíbrio de adsorção, bem como da quantidade de substância em estudo adsorvida no estado de equilíbrio. As figuras 1 e 2 do apêndice 5 fornecem exemplos das referidas representações. O tempo necessário para atingir o equilíbrio traduz-se no tempo de que o sistema necessita para atingir o patamar de equilíbrio.

([1]) A representação gráfica da concentração da substância de ensaio na fase aquosa ($\left(C_{aq}^{ads}\right)$) em função do tempo pode também ser utilizada na estimativa do instante em que é atingido o patamar de equilíbrio (ver figura 2 do apêndice 5).

▼B

Se, no caso de um determinado solo, não se observar a ocorrência de qualquer patamar, mas antes um aumento constante, tal facto pode ser devido a factores de perturbação tais como a biodegradação ou difusão lenta. Pode averiguar-se a ocorrência de biodegradação repetindo o ensaio com uma amostra de solo esterilizada. Caso não se observe também qualquer patamar, o experimentador deve averiguar a ocorrência de outro fenómeno possível no caso específico em questão, procedendo a alterações adequadas das condições experimentais (temperatura, tempos de agitação, razões solo/solução). Compete ao experimentador decidir o prosseguimento do ensaio apesar da eventual impossibilidade de atingir o equilíbrio.

1.9.2.3. *Adsorção na superfície do recipiente de ensaio e estabilidade da substância em estudo*

A análise das amostras de controlo permite obter informações sobre a adsorção da substância em estudo na superfície dos recipientes de ensaio, bem como sobre a respectiva estabilidade. Caso se observe uma perda superior ao erro-padrão do método analítico utilizado, esta pode dever-se a uma degradação abiótica e/ou adsorção na superfície do recipiente de ensaio. Estes fenómenos são distinguíveis mediante a lavagem das paredes do recipiente com um volume conhecido de um solvente adequado, seguida de determinação da substância em estudo na solução resultante da lavagem. Se não ocorrer adsorção na superfície do recipiente de ensaio, a perda reflecte a instabilidade abiótica da substância em estudo. Caso se observe a ocorrência de adsorção, é necessário utilizar recipientes de outro material. De referir que os dados relativos à adsorção na superfície dos recipientes de ensaio assim obtidos não são directamente extrapoláveis para o ensaio solo/solução, uma vez que a presença de solo afecta o processo de adsorção.

Podem obter-se informações adicionais sobre a estabilidade da substância em estudo através do cálculo do balanço de massas em função do tempo. Tal implica a determinação da substância em estudo na fase aquosa, em extractos do solo e nas paredes do recipiente de ensaio. A diferença entre a massa de substância em estudo adicionada e a soma das massas da mesma substância na fase aquosa, nos extractos de solo e no recipiente de ensaio corresponde à massa degradada e/ou volatilizada e/ou não extraída. A determinação do balanço de massas apenas deve ser efectuada se o equilíbrio de adsorção tiver sido atingido no período de ensaio.

O balanço de massas é determinado para ambos os solos, bem como para uma razão solo/solução por solo com uma perda superior a 20 % e, preferentemente, superior a 50 %, no estado de equilíbrio. Após a análise da última amostra de fase aquosa, decorridas 48 h do início do ensaio, as fases são separadas por centrifugação e eventualmente filtradas. A fase aquosa é recuperada na maior extensão possível, adicionando-se de seguida ao solo um solvente de extracção adequado, com um coeficiente de extracção mínimo de 95 %, de modo a extrair a substância em estudo. Recomenda-se a realização de duas extracções sucessivas. Determina-se então a quantidade de substância em estudo presente no solo e nos extractos dos recipientes, procedendo-se ao cálculo do balanço de massas (equação 10 da secção «Apresentação dos resultados»). Caso o referido balanço seja inferior a 90 %, a substância deve considerar-se instável no intervalo de duração do ensaio. Podem, contudo, prosseguir-se os estudos, tendo em devida conta a referida instabilidade; neste caso, recomenda-se a análise de ambas as fases no ensaio principal.

▼B

1.9.3. *Etapa 2 — Cinética de adsorção para uma determinada concentração da substância em estudo*

Utilizam-se cinco solos, seleccionados com base no quadro 1. É conveniente utilizar alguns dos solos (ou mesmo todos) utilizados no ensaio preliminar. Neste caso, não deverá repetir-se a etapa 2 para os solos utilizados no referido ensaio.

O tempo necessário para atingir o equilíbrio, a razão solo/solução, a massa da amostra de solo, o volume de fase aquosa em contacto com o solo e a concentração da substância em estudo na solução são seleccionados com base nos resultados do ensaio preliminar. De preferência, deve efectuar-se a análise após um tempo de contacto aproximado de duas, quatro, seis, oito (eventualmente também 10) e 24 h; caso os resultados dos ensaios de das razões mostrem que um determinado produto necessita de tempos de exposição superiores, o tempo de agitação pode ser aumentado para, no máximo, 48 h. O estabelecimento dos referidos tempos deve, contudo, ser encarado de modo flexível.

Cada ensaio com um tipo específico de solo e uma solução deve ser efectuado pelo menos em duplicado, de modo a permitir estimar a variância dos resultados. Deve também realizar-se em cada caso um ensaio em branco, utilizando uma massa de amostra de solo e um volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M idênticos aos utilizados no ensaio principal, na ausência da substância em estudo. Deve aplicar-se o mesmo procedimento de ensaio a uma amostra de controlo contendo apenas a substância em estudo dissolvida na solução de $CaCl_2$ 0,01 M, na ausência de solo, como medida de precaução contra factores imprevistos.

A percentagem de adsorção é calculada em cada instante A_{t_i} e/ou em cada intervalo $A_{\Delta t_i}$ (de acordo com as necessidades), sendo representada graficamente em função do tempo. Calcula-se também o coeficiente de distribuição no equilíbrio, K_d, bem como o coeficiente de adsorção normalizado em relação ao carbono orgânico, K_{oc} (aplicável a substâncias orgânicas não polares).

Resultados do ensaio de cinética de adsorção

De modo geral, o valor linear de K_d é suficientemente preciso para descrever o comportamento do solo em termos de adsorção/-dessorção (35) (78), constituindo uma expressão da mobilidade característica da substância no solo. Considera-se, por exemplo, que as substâncias com $K_d \leq 1$ cm^3 g^{-1} apresentam uma mobilidade qualitativa apreciável. Além disso, MacCall *et al.* (16) desenvolveram um método de classificação da mobilidade com base nos valores de K_{oc}. Existem também sistemas de classificação da lixiviação baseados na relação entre K_{oc} e DT-50 ([1]) (32) (79).

Por outro lado, de acordo com os estudos de análise de erros (61), os valores de K_d inferiores a 0,3 cm^3 g^{-1} não podem ser estimados de forma rigorosa com base no decréscimo da concentração da fase aquosa, mesmo quando se utiliza a razão solo/solução mais favorável do ponto de vista da precisão, ou seja, 1:1. Neste caso, recomenda-se proceder à análise de ambas as fases (solo e solução).

([1]) DT-50: tempo necessário para a degradação de 50 % da substância em estudo.

▼B

Relativamente às observações *supra*, recomenda-se que o estudo do comportamento da substância no solo em termos de adsorção, bem como da sua mobilidade potencial, seja seguido da determinação das isotérmicas de adsorção de Freundlich para os sistemas que permitam uma determinação rigorosa de K_d através do protocolo experimental descrito no presente método. Essa determinação é possível caso o valor resultante da multiplicação de K_d pela razão solo/solução seja superior a 0,3, sempre que as determinações sejam baseadas no decréscimo de concentração da fase aquosa (método indirecto), ou superior a 0,1, quando se procede à análise de ambas as fases (método directo) (61).

1.9.4. *Etapa 3 — Isotérmicas de adsorção e cinética de dessorção/-isotérmicas de dessorção*

1.9.4.1. Isotérmicas de adsorção

Utilizam-se cinco concentrações da substância em estudo, que deverão abranger, de preferência, duas ordens de grandeza; na selecção das referidas concentrações, devem ter-se em conta a solubilidade em água e as concentrações de equilíbrio resultantes. Para cada solo, deve utilizar-se ao longo de todo o ensaio a mesma razão solo/-solução. O ensaio de adsorção é efectuado do modo descrito supra, embora a fase aquosa seja analisada uma única vez, após o tempo necessário para atingir o equilíbrio, estabelecido na etapa 2. Determinam-se as concentrações da solução no equilíbrio, calculando-se a quantidade adsorvida com base na perda da substância em estudo na solução ou pelo método directo. Representa-se graficamente a massa adsorvida por unidade de massa do solo em função da concentração de equilíbrio da substância em estudo (ver secção «Apresentação dos resultados»).

Resultados do ensaio para a determinação das isotérmicas de adsorção

De entre os diversos modelos matemáticos de adsorção propostos, a isotérmica de Freundlich constitui um dos mais frequentemente utilizados para descrever os processos de adsorção. As referências (41) (45) (80) (81) (82) fornecem informações mais pormenorizadas sobre a interpretação e importância dos modelos de adsorção.

Nota: Deve referir-se que a comparação dos valores de K_F (coeficiente de adsorção de Freundlich) de diversas substâncias apenas é possível se os referidos valores forem expressos nas mesmas unidades (83).

1.9.4.2. Cinética de dessorção

O objectivo do ensaio consiste em averiguar a reversibilidade ou irreversibilidade da adsorção de uma substância no solo, informação importante na medida em que o processo de dessorção desempenha um papel considerável no comportamento da substância no solo. Além disso, os dados de dessorção são utilizados na modelização por computador de processos de lixiviação e escoamento de substâncias dissolvidas. Caso se pretenda efectuar um estudo de dessorção, recomenda-se a aplicação do protocolo descrito *infra* a cada sistema relativamente ao qual foi possível efectuar uma determinação rigorosa de K_d no ensaio de cinética de adsorção precedente.

Tal como no estudo de cinética de adsorção, existem duas opções para efectuar o ensaio de cinética de dessorção: a) método paralelo; b) método sequencial. A selecção da metodologia a adoptar é deixada ao critério do experimentador, que deverá ter em conta as condições e os recursos laboratoriais disponíveis.

▼B

a) Método paralelo: para cada tipo de solo seleccionado para o ensaio de dessorção, preparam-se amostras com a mesma razão solo/solução em número igual ao número de intervalos de tempo em que pretende estudar-se a cinética de dessorção. Devem usar-se, de preferência, os intervalos de tempo do ensaio de cinética de adsorção; pode, contudo, prolongar-se de forma adequada o tempo total, de modo a permitir que o sistema atinja o equilíbrio de dessorção. Deve efectuar-se um ensaio em branco para cada tipo de solo e concentração da solução, utilizando uma massa de solo e um volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M idênticos aos do ensaio principal, na ausência da substância em estudo. Deve ainda aplicar-se o mesmo procedimento de ensaio a uma amostra de controlo contendo apenas a substância em estudo dissolvida na solução de $CaCl_2$ 0,01 M, na ausência de solo. Agitam-se as misturas solo-solução até atingir o equilíbrio de adsorção, como determinado na etapa 2. Procede-se de seguida à separação das fases por centrifugação, recolhendo as fases aquosas na maior extensão possível. Os volumes de solução recolhidos são substituídos por iguais volumes de $CaCl_2$ 0,01 M, na ausência de substância em estudo, agitando de novo. Removem-se as fases aquosas de modo tão completo quanto possível, efectuando-se determinações após, por exemplo, duas h, no caso do primeiro tubo, quatro h no caso do segundo, seis h no caso do terceiro, etc. até atingir o equilíbrio de dessorção;

b) Método sequencial: após o ensaio de cinética de adsorção, a mistura é centrifugada e a fase aquosa remo vida na maior extensão possível. O volume de solução removida é substituído por igual volume de $CaCl_2$ 0,01 M, na ausência da substância em estudo. A nova mistura é agitada até atingir o equilíbrio de dessorção. Durante este período, procede-se à centrifugação da mistura a intervalos regulares, de modo a separar as fases. Determina-se de imediato a substância em estudo numa pequena alíquota da fase aquosa, prosseguindo o ensaio com a mistura original. O volume de cada alíquota recolhida deve ser inferior a 1 % do volume total. Adiciona-se à mistura uma quantidade igual de solução de $CaCl_2$ 0,01 M, com o objectivo de manter a razão solo/solução, mantendo a agitação até ao próximo intervalo.

Calcula-se a percentagem de dessorção em cada instante ((D_{t_i})) e/ou intervalo ($(D_{\Delta t_i})$) (de acordo com o objectivo do estudo), representando-a graficamente em função do tempo. Calcula-se também o coeficiente de dessorção no equilíbrio, K_{des}. As equações a aplicar são fornecidas na secção «Apresentação dos resultados» e no apêndice 5.

Resultados do ensaio de cinética de dessorção

A representação gráfica da percentagem de dessorção D_{t_i} e adsorção A_{t_i} em função do tempo permite estimar a reversibilidade do processo de adsorção. Caso o equilíbrio de dessorção seja atingido, mesmo num tempo duplo do tempo de equilíbrio de adsorção, e a dessorção total seja superior a 75 % da quantidade adsorvida, o processo de adsorção é considerado reversível.

1.9.4.3. Isotérmicas de dessorção

As isotérmicas de dessorção de Freundlich são determinadas nos solos utilizados no ensaio das isotérmicas de adsorção. O ensaio de dessorção é efectuado em conformidade com o protocolo descrito na secção «Cinética de dessorção», com a única diferença de que a fase aquosa é analisada uma única vez, no estado de equilíbrio de dessorção. Calcula-se a quantidade de substância em estudo dessorvida, representando graficamente o teor de substância em estudo que permanece adsorvida no solo no estado de equilíbrio de dessorção em função da concentração de equilíbrio da substância em estudo na solução (ver a secção «Apresentação dos resultados» e o apêndice 5).

▼B

2. **APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS**

Os dados analíticos são apresentados na forma de quadro (ver apêndice 6). Deve fornecer-se os resultados das várias determinações e as médias calculadas, bem como as representações gráficas das isotérmicas de adsorção. Os cálculos são efectuados do modo descrito *infra*.

Para os fins do ensaio, considera-se que 1 cm^3 de solução aquosa possui a massa de 1 g. Deste modo, a razão solo/solução pode ser expressa em massa/massa ou massa/volume com o mesmo valor numérico.

2.1. ADSORÇÃO

A adsorção (A_{t_i}) é definida como a percentagem de substância adsorvida no solo, relativamente à quantidade presente no início do ensaio e nas condições em causa. Caso a substância em estudo seja estável e não ocorra uma adsorção significativa nas paredes do recipiente, o valor de A_{t_i} em cada instante t_i é calculado através da equação:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (3)$$

em que:

A_{t_i} = percentagem de adsorção no instante t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = massa de substância em estudo adsorvida no solo no instante t_i (μg);

m_0 = massa de substância em estudo presente no recipiente de ensaio, no início do mesmo (μg).

O apêndice 5 fornece informações pormenorizadas sobre o modo de cálculo da percentagem de adsorção A_{t_i} tanto no caso do método paralelo corno do método sequencial.

O coeficiente de distribuição K_d é a razão entre o teor de substância na fase edáfica e a concentração mássica da mesma na solução aquosa ao atingir o equilíbrio de adsorção, nas condições de ensaio.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

em que:

$C_s^{ads}(eq)$ = teor de substância adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção (μg g^{-1});

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = concentração mássica da substância na fase aquosa no estado de equilíbrio de adsorção (μg cm^{-3}), cuja determinação analítica tem em conta os valores obtidos nos ensaios em branco;

$m_s^{ads}(eq)$ = massa de substância adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa de substância presente na solução, no estado de equilíbrio de adsorção (μg);

m_{solo} = quantidade de fase edáfica, expressa em massa seca de solo (g);

V_0 = volume inicial de fase aquosa em contacto com o solo (cm^3).

A relação entre A_{eq} e K_d é dada por:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

em que:

A_{eq} = percentagem de adsorção no estado de equilíbrio de adsorção, %.

O coeficiente de adsorção normalizado relativo ao carbono orgânico K_{oc} exprime o coeficiente de distribuição K_d em função do teor de carbono orgânico da amostra de solo:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \ (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

em que:

%OC = percentagem de carbono orgânico na amostra de solo (g g^{-1}).

O coeficiente K_{oc} constitui um parâmetro característico da partição do carbono orgânico entre o solo ou sedimento e a água, nomeadamente no caso de compostos orgânicos não polares. Existe uma correlação entre a adsorção das referidas substâncias e o teor de carbono orgânico do sólido adsorvente (7); os valores de K_{nc} dependem das características específicas das fracções húmicas cuja capacidade de adsorção diferem de modo considerável, devido, nomeadamente, à sua origem ou génese diversa.

2.1.1. **Isotérmicas de adsorção**

A equação que exprime as isotérmicas de adsorção de Freundlich relaciona a quantidade de substância em estudo adsorvida com a concentração da substância em estudo na solução, no estado de equilíbrio (equação 8).

Os dados são processados de modo idêntico ao descrito na secção «Adsorção», calculando-se, para cada recipiente de ensaio, o teor de substância em estudo adsorvida no solo após o ensaio de adsorção [$C_s^{ads}(eq)$, por vezes designado por x/m]. Presume-se que o equilíbrio foi atingido e que $C_s^{ads}(eq)$ representa o valor no estado de equilíbrio:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] \cdot V_0}{m_{soil}} \ (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

A equação de adsorção de Freundlich é dada por (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \ (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

ou, na forma linear:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

em que:

K_F^{ads} = Coeficiente de adsorção de Freundlich, cujas dimensões são de $cm^3\ g^{-1}$ apenas nos casos em que l/n = 1: em todos os restantes casos, o declive l/n é introduzido na dimensão de K_F^{ads} $(\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}\ g^{-1})$;

n = constante de regressão; l/n situa-se, de modo geral, entre 0,7 e 1,0, mostrando que os dados de adsorção/-dessorção são, com frequência, ligeiramente não lineares.

Aplicam-se as equações (8) e (9), sendo os valores de K_F^{ads} e l/n calculados por regressão linear, com o auxílio da equação 9. Calcula-se também o coeficiente de correlação r^2 da equação logarítmica. A figura 2 fornece um exemplo das representações em causa.

▼B

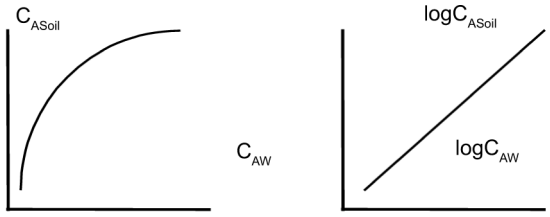


Figura 2. Gráficos de adsorção de Freundlich (normal e linearizado)

2.1.2. **Balanço de massas**

O balanço de massas (MB) é definido como a percentagem de substância inicialmente presente que pode ser analiticamente recuperada na sequência de um ensaio de adsorção.

O tratamento dos dados é diferente no caso de solventes totalmente miscíveis em água, podendo aplicar-se o método descrito na secção «Dessorção» para determinar a quantidade de substância recuperada por extracção com solvente. Se o solvente for menos miscível em água, deve determinar-se a quantidade recuperada.

O balanço de massas MB do processo de adsorção é calculado do modo que se segue; assume-se que o termo (m_E) corresponde à soma das massas da substância em estudo extraídas do solo e das paredes do recipiente de ensaio com um solvente orgânico:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \ (\%) \qquad (10)$$

em que:

MB = balanço de massas (%);

m_L = massa total de substância em estudo extraída do solo e das paredes do recipiente de ensaio em duas etapas (μg);

C_0 = concentração inicial da solução de ensaio em contacto com o solo (μg cm^{-3}):

V_{rec} = volume de sobrenadante recuperado após atingir o equilíbrio de adsorção (cm^{-3}).

2.2. DESSORÇÃO

A dessorção (D) é definida como a percentagem dessorvida de substância em estudo, relativamente à quantidade previamente adsorvida, nas condições de ensaio:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

em que:

D_{t_i} = percentagem de dessorção no instante t_i (%);

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massa de substância em estudo dessorvida do solo no instante t_i (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = massa de substância em estudo adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção (μg).

O apêndice 5 fornece directrizes para o cálculo da percentagem de dessorção D_{ti} no caso dos métodos paralelo e sequencial.

O coeficiente de dessorção aparente (K_{des}) é a razão entre a quantidade de substância que permanece na fase edáfica e a concentração mássica da substância dessorvida na solução aquosa, ao atingir o estado de equilíbrio de dessorção, nas condições de ensaio:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)\ V_T}{m_{aq}^{des}(eq) \qquad m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \tag{12}$$

em que:

K_{des} = coeficiente de dessorção ($cm^3\ g^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massa total de substância em estudo dessorvida do solo no estado de equilíbrio de dessorção (μg);

V_t = volume total da fase aquosa em contacto com o solo durante o ensaio de cinética de dessorção (cm^3).

A secção «Dessorção» do apêndice 5 fornece directrizes para o cálculo de $m_{aq}^{des}(eq)$.

Nota:

Caso o ensaio de adsorção precedente tenha sido efectuado pelo método paralelo, considera-se que o volume V_T da equação (12) é igual a V_0.

2.2.1. **Isotérmicas de dessorção**

A equação que exprime as isotérmicas de dessorção de Freundlich relaciona o teor de substância em estudo que permanece adsorvida no solo com a concentração de substância em estudo presente na solução no estado de equilíbrio de dessorção (equação 16).

Para cada recipiente de ensaio, o teor de substância que permanece adsorvida no solo no estado de equilíbrio de dessorção é calculado através da equação:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \tag{13}$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ é definida como:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^{A}\ (\mu g) \tag{14}$$

em que:

$C_s^{des}(eq)$ = teor de substância em estudo que permanece adsorvida no solo no estado de equilíbrio de dessorção ($\mu g\ g^{-1}$):

$m_m^{des}(eq)$ = massa de substância determinada analiticamente na fase aquosa, no estado de equilíbrio de dessorção (μg);

▼B

m_{aq}^{A} = massa de substância em estudo remanescente do equilíbrio de adsorção devido a uma substituição incompleta de volumes (μg);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massa de substância na solução no estado de equilíbrio de adsorção (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_r^F = volume de solução recolhido do recipiente para determinação da substância em estudo, no estado de equilíbrio de dessorção (cm^3);

V_R = volume de sobrenadante removido do tubo ao atingir o estado de equilíbrio de adsorção e substituído pelo mesmo volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3);

A equação de dessorção de Freundlich é dada por (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \ (\mu g \ g^{-1}) \quad (16)$$

ou, na forma linear:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

em que:

K_F^{des} = coeficiente de dessorção de Freundlich;

n = constante de regressão;

$C_{aq}^{des}(eq)$ = concentração mássica da substância na fase aquosa, no estado de equilíbrio de dessorção (μg cm^{-3}).

As equações (16) e (17) podem ser representadas graficamente, calculando-se os valores de K_F^{des} e l/n por regressão linear, através da equação 17.

Nota:

Caso o expoente l/n da equação de adsorção ou dessorção de Freundlich seja unitário, a constante de adsorção ou dessorção de Freundlich (K_F^{ads} e K_F^{des}) é igual à constante de equilíbrio de adsorção ou dessorção (K_d e K_{des}), respectivamente, sendo lineares as representações de C_s em função de C_{aq}. Caso os referidos expoentes sejam diferentes de 1, a representação de C_s *versus* C_{aq} será não linear, variando as constantes de adsorção e dessorção ao longo das isotérmicas.

2.2.2. **Relatório do ensaio**

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

— Identificação completa das amostras de solo utilizadas, incluindo:

— identificação geográfica do local (latitude, longitude),

— data de recolha das amostras,

▼B

— perfil de utilização do solo (por exemplo, solo agrícola, florestal, etc.),

— profundidade da recolha de amostras,

— teor de areia/sedimentos/argila,

— valores de pH (em solução de $CaCl_2$ 0,01 M),

— teor de carbono orgânico,

— teor de matéria orgânica,

— teor de azoto,

— razão C/N,

— capacidade de permuta catiónica (mmol/kg),

— todas as informações relativas à recolha e armazenagem das amostras de solo,

— se adequado, quaisquer informações relevantes para a interpretação dos processos de adsorção-dessorção da substância em estudo,

— referência aos métodos utilizados para a determinação de cada parâmetro,

— informações adequadas sobre a substância em estudo,

— temperatura de ensaio,

— condições de centrifugação,

— processo analítico utilizado para a análise da substância em estudo,

— justificação do eventual recurso a um agente de solubilização na preparação da solução-mãe da substância em estudo,

— explicação das correcções efectuadas nos cálculos, se for caso disso,

— dados apresentados em conformidade com o formulário do apêndice 6 e representações gráficas,

— quaisquer informações e observações úteis para a interpretação dos resultados do ensaio.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

(5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate. Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate. Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/-Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), «Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils», in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980), «Adsorption-Desorption Phenomena» in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, p. 83-122.

(14) Hasset J. J., and Banwart W.L., (1989), The sorption of nonpolar organics by soils and sediments' in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, p. 31-44.

(15) van Genuchten M. Th., Davidson J. M., and Wierenga P. J., (1974), «An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media». Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), p. 29-35.

(16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., and Dishburger H. J., (1981), «Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis», in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S. M, Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), «Movement and sorption of chemicals applied to the soil». Weeds, 13, p. 185-190.

(18) Rhodes R. C, Belasco L. J., and Pease H. L, (1970) «Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils». J.Agric.Food Chem., 18, p. 524-528.

(19) Russell M. H., (1995), «Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil» in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), «Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides», IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, p. 901-932.

▼B

(21) Guth J. A., Burkhard N., and D. O. Eberle, (1976), «Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils». Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, p. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C. G. L., and Osgerby J. M., (1967), «Persistence of herbicides in soil». J. Sci. Fd Agric, 18, pp. 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), «Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-l,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption». Pestic. Sci. 12, p. 45-52.

(24) Guth J. A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977), «Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides». Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, p. 961-971.

(25) Osgerby J. M., (1973), «Process affecting herbicide action in soil». Pestic. Sci., 4, p. 247-258.

(26) Guth J. A., (1972), «Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden». Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, p. 143-154.

(27) Hamaker J. W., (1975), «The interpretation of soil leaching experiments», in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), p. 1 3 5-1 72, Plenum Press, NY.

(28) Helling C. S., (1971), «Pesticide mobility in soils». Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, p. 732-210.

(29) Hamaker J. W., (1972), «Diffusion and volatilization» in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds). Vol. I, p. 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), «Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system». Pestic. Sci. 12, p. 37-44.

(31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, p. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D. I., (1989), «Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability». J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), p. 339-357.

(33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). «Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils». J. of Soil Sci., 28, p. 340-350.

(34) Bromilov R. H., and Leistra M., (1980), «Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils». Pest. Sci., 11, p. 389-395.

(35) Green R. E., and Karickoff S. W., (1990), «Sorption estimates for modeling», in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, p. 80-101,

(36) Lambert S. M., (1967), «Functional relationship between sorption in soil and chemical structure». J. Agri. Food Chem., 15, p. 572-576.

▼B

(37) Hance R. J., (1969), «An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils». J. Agri. Food Chem., 17, p. 667-668.

(38) Briggs G. G. (1969), «Molecular structure of herbicides and their sorption by soils». Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G. G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor'. J. Agric. Food Chem., 29, p. 1050-1059.

(40) Sabljic A., (1984), «Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology». J. Agric. Food Chem., 32, p. 243-246.

(41) Bailey G. W., and White J. L., (1970), «Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil». Residue Rev., 32, p. 29-92.

(42) Bailey G. W., J. L.. White and Y. Rothberg., (1968), «Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate». Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: p. 222-234.

(43) Karickhoff S. W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere 10, p. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), «Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners». Environ. Toxicol. Safety 21, p. 1-17.

(45) Hamaker J. W., and Thompson J. M, (1972), «Adsorption in organic chemicals» in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, p. 49-143.

(46) Deli J., and Warren G. F., 1971, «Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils». Weed Sci. 19: p. 67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J. M. and Santelmann, (1975), «Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils». Weed Science, Vol. 23, p. 454-457.

(48) Haues M. H. B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), «Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations» in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p. 75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H. B., and Deangelis R. J., (1980), «Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase», CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects: chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11 th edition.

(52) Black, Evans D. D., White J. L, Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. «Methods of Soil Analysis», Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), «Precision in pesticide adsorption measurements». Soil Sci. Am. Proc, 34, p. 35 3-354.

(60) Grover R., and Hance R. J. (1970), «Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine». Soil Sci., p. 109-138.

(61) Boesten, J. J. T. I, «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system». Pest. Sci. 1990, 30, p. 31-41.

(62) Boesten, J. J. T. I. «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106». Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J. Cantier J. M, et Coste C. (1980), «Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique». Weed Res. 21, p. 227-231.

(64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), «Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments». J. Environ.Qual., 10(3), p. 382-386.

(65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), «Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water». Environ. Sei. Technol., 17(4), p. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), «Sorption of organic substances by soils and sediments». J. Environm. Sci. Health, B19 (3), p. 297-312.

(67) Vowles P. D., and Mantoura R. F. C, (1987), «Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons». Chemosphere, 16(1), p. 109-116.

(68) Lyman W. J., Reehl W. F.and Rosenblatt D. H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980). «Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota» in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), p. 78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), «A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds». Science, Vol. 206, p. 831-832.

(71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G., and Means J. C., (1981), «Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption». Soil Sci. Soc. Am. J. 45, p. 38-42.

(72) Karickhoff S. W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere, Vol. 10(8), p. 8 3 3-846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), «Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité». Revue de l'Agric., 34 (4), p. 319-322.

(74) Müller M., Kördel W. (1996), «Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil». Chemosphere, 32(12), p. 2493-2504.

(75) Kördel W., Kotthoff G., Miiller M. (1995), «HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test». Chemosphere 30 (7), p. 1373-1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), «HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficicnt on soil — comparison of different stationary phases». Chemosphere 27 (12), p. 2341-2352.

(77) Hance, R. J., (1967), «The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides». Weed Research, Vol. 7, p. 29-36.

(78) Koskinen W. C, and Harper S. S., (1990), «The retention processes: mechanisms» in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G. (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, p. 297-325, ACS Symp. Ser. 2 59, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C. H., (1970), «Interpretation and use of sorption isotherms» in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, p. 14-32.

(81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960). «Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils». J. Chem. Soc, p. 397 3-93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J. C., (1980), «Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de 1'adsorption». Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996), «Anomalies in the Freundlich equation», Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

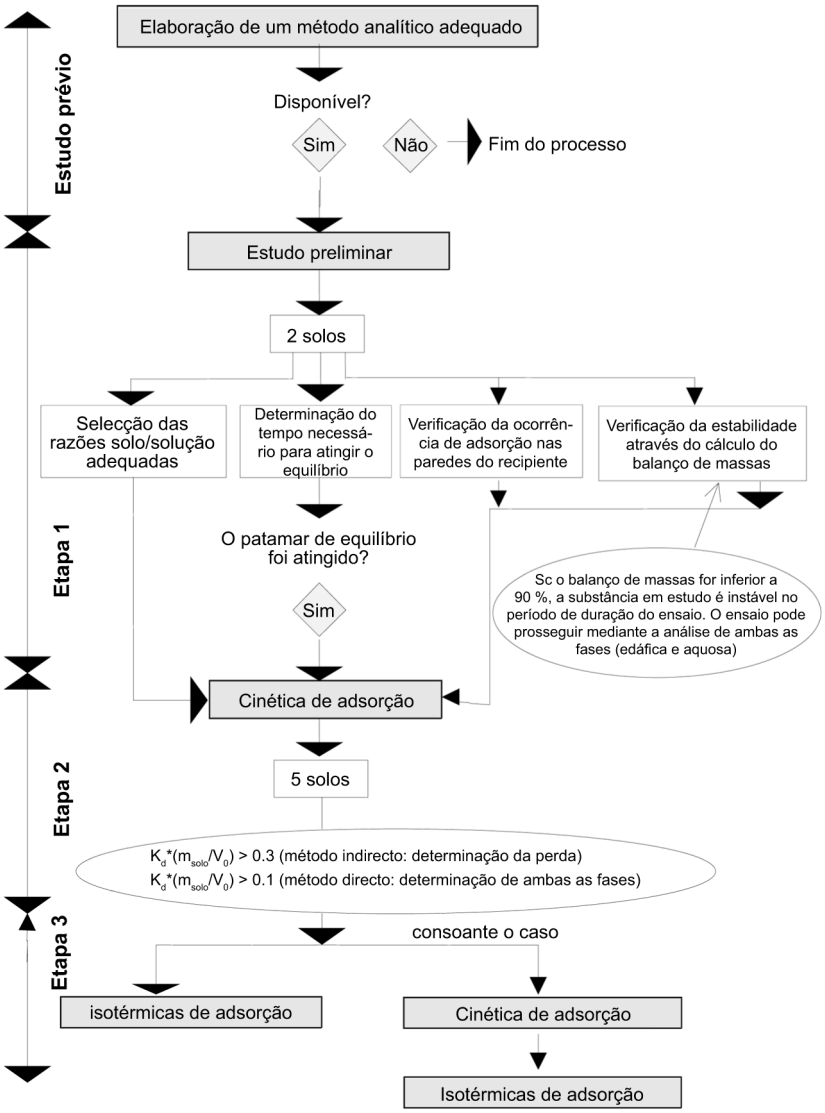
(84) Guth, J. A., (198 5), «Adsorption/desorption», in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

Apêndice 1

Protocolo de ensaio



▼B

Apêndice 2

INFLUÊNCIA DO RIGOR DO MÉTODO ANALÍTICO E DAS ALTERAÇÕES DE CONCENTRAÇÃO NOS RESULTADOS DE ADSORÇÃO

A análise do quadro infra (84) torna evidente que, caso a diferença entre a massa inicial (m_0 = 110 µg) e a massa de equilíbrio ($m^{ads}_{aq}(eq)$ = 100 µg] da substância em estudo na solução seja bastante reduzida, um erro de 5 % na determinação da concentração de equilíbrio resulta num erro de 50 % no cálculo do teor de substância adsorvida no solo ($m^{ads}_{s}(eq)$ e de 52,4 % no cálculo de K_d.

Quantidade de solo m_{solo} = 10 g

Volume de solução V_0 = 100 cm^3

	$m^{ads}_{aq}(eq)$ (µg)	$C^{ads}_{aq}(eq)$ (µg cm^{-3})	R	$m^{ads}_{s}(eq)*$ (µg)	$C^{ads}_{s}(eq)*$ (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
	A = 9 %							
m_0 = 110 µg ou C_0 = 1,100 µg/cm^3	100	1,000	valor real	10	1,00	valor real	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	A = 55 %							
m_0 = 110 µg ou C_0 = 1,100 µg/cm^3	50,0	0,500	valor real	60,0	6,00	valor real	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	A = 99 %							
m_0 = 110 µg ou C_0 = 1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	valor real	108,9	10,89	valor real	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

onde:

$*m^{ads}_{s}(eq) = m_0 - m^{ads}_{aq}(eq)$, $C^{ads}_{s}(eq) = \frac{[C_0 - C^{ads}_{aq}(eq)]\,V_0}{m_{soil}}$. $Kd = \frac{m^{ads}_{s}(eq)}{m^{ads}_{aq}(eq)}\,\frac{V_0}{m_{soil}}$

$m^{ads}_{s}(eq)$ = massa da substância em estudo no solo, no estado de equilíbrio, µg

$m^{ads}_{aq}(eq)$ = massa da substância em estudo na fase aquosa, no estado de equilíbrio, µg

$C^{ads}_{s}(eq)$ = teor da substância em estudo no solo, no estado de equilíbrio, µg g^{-1}

$C^{ads}_{aq}(eq)$ = concentração mássica da substância em estudo na fase aquosa, no estado de equilíbrio, µg cm^{-3}

R = erro analítico na determinação de $m^{ads}_{aq}(eq)$;

R‡ = erro calculado devido ao erro analítico R.

▼B

Apêndice 3

TÉCNICAS DE ESTIMATIVA DE K_D

1. O recurso a técnicas de estimativa permite prever o valor de K_d com base na correlação, nomeadamente com os valores de P_{ow} (12) (39) (63-68), solubilidade em água (12) (19) (21) (39) (68-73) ou polaridade decorrentes da análise por HPLC de fase reversa (74-76) Como se mostra nos quadros 1 e 2, os valores de K_{oc} e K_{om} são calculados com base nas equações que se seguem, sendo o valor de K_d determinado de forma indirecta:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1})$$

2. As referidas correlações baseiam-se em dois pressupostos: (1) o teor de matéria orgânica de um solo é o principal factor determinante da adsorção de uma substância nesse solo: (2) as interacções envolvidas são principalmente não polares. Em consequência, as referidas correlações: (1) não são aplicáveis, ou apenas são parcialmente aplicáveis, a substâncias polares: (2) não são aplicáveis aos casos em que o teor de matéria orgânica dos solos seja bastante reduzido (12). Além disso, embora seja possível obter correlações satisfatórias entre os valores de P_{ow} e da adsorção (19), o mesmo não sucede no que respeita à relação entre a solubilidade em água e a extensão da adsorção (19) (21): os estudos realizados até ao presente têm-se revelado bastante contraditórios.

3. Os quadros 1 e 2, respectivamente, fornecem alguns exemplos de correlações entre os coeficientes de adsorção e os coeficientes de partição octanol-água, bem como a solubilidade em água.

Quadro 1.

Exemplos de correlações entre o coeficiente de distribuição de adsorção e o coeficiente de partição octanol-água: para mais exemplos, ver as referências (12) (68)

Substâncias	Correlações	Autores
Diversos pesticidas	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Compostos aromáticos clorados	$\log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou *et al*. (1983) (65)
Diversos pesticidas	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl e Mingelgrin (1984) (66)
Hidrocarbonetos aromáticos	$\log K_{oc} = - 2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles e Mantoura (1987) (67)

Quadro 2.

Exemplos de correlações entre o coeficiente de distribuição de adsorção e a solubilidade em água; para mais exemplos, ver as referências (68) (69)

Substâncias	Correlações	Autores
Diversos pesticidas	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl e Mingelgrin (1984) (66)
Compostos alifáticos e aromáticos clorados	$\log K_{om} = (4,040 +/- 0,038) - (0,557 +/- 0,012) \log S_w$	Chiou *et al*. (1979) (70)
α-naphtol	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Compostos cíclicos (alifáticos e aromáticos	$\log K_{oc} = - 1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Diversas substâncias	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

Apêndice 4

CÁLCULOS PARA A DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CENTRIFUGAÇÃO

1. O tempo de centrifugação é dado pela seguinte fórmula, presumindo que as partículas possuem forma esférica:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 r p^2 (\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln (R_b/R_t) \qquad (1)$$

Por motivos de simplificação, todos os parâmetros são apresentados em unidades não pertencentes ao SI (g, cm).

ω = velocidade angular (=2 π rpm/60), rad s^{-1};

rpm = rotações por minuto;

η = viscosidade da solução, g s^{-1} cm^{-1};

r_p = raio das partículas, cm;

p_s = densidade do solo, g cm^{-3};

p_{aq} = densidade da solução, g cm^{-3};

R_t = distância do centro do rotor da centrifugadora ao topo da solução no tubo de ensaio, cm;

R_b = distância do centro do rotor da centrifugadora à base do tubo de ensaio, cm;

R_b-R_t = altura da mistura solo/solução no tubo de ensaio, cm.

Na prática, devem utilizar-se tempos duplos dos calculados, de modo a garantir a separação completa.

2. A equação (1) pode ser simplificada, considerando que a viscosidade (η) e a densidade (p_{aq}) da solução são iguais à viscosidade e densidade da água a 25 ºC; obtém-se, assim, n = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} and p_{aq} = 1,0 g, cm^{-3}.

O tempo de centrifugação é dado pela fórmula (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \qquad (2)$$

3. A equação 2 mostra a importância de dois parâmetros, designadamente o tempo (t) e a velocidade (rpm), na definição das condições de centrifugação tendo cm vista a separação de partículas de dimensões específicas (no caso em estudo 0,1 um radianos): (1) a densidade do solo e (2) a altura da mistura no tubo de ensaio (R_b-R_t), ou seja, a distância entre o topo da solução e a base do tubo; como é óbvio, para um determinado volume, a altura da mistura no tubo depende do quadrado do respectivo raio.

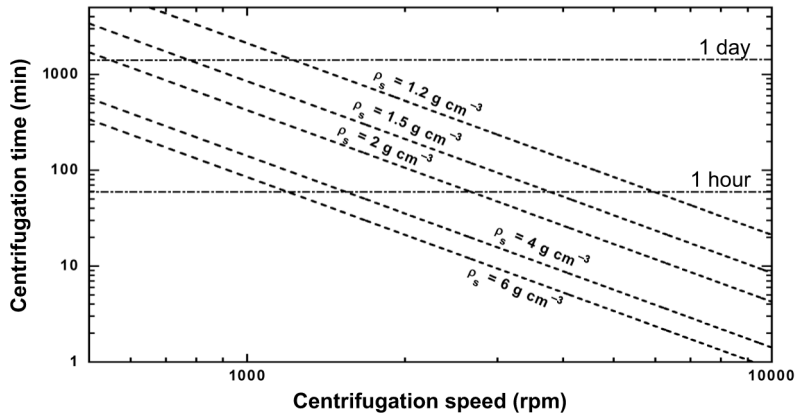
4. A figura 1 apresenta o gráfico da variação do tempo de centrifugação (t) em função da velocidade de centrifugação (rpm), para solos de densidades diversas (p_s) (fig. 1a) e diversas alturas da mistura nos tubos de ensaio (fig. lb). A figura 1a evidencia a influência da densidade do solo; por exemplo, para um perfil de centrifugação clássico de 3 000 rpm o tempo de centrifugação é da ordem de 240 minutos para um solo de 1,2 g cm^3 de densidade, sendo de apenas 50 minutos para uma densidade de 2,0 g cm^3. Do mesmo modo, a figura lb mostra que, para um perfil de centrifugação clássico de 3 000 rpm o tempo de centrifugação é de cerca de 50 minutos para uma altura da mistura de 10 cm e apenas 7 minutos para uma altura de 1 cm. Todavia, é conveniente adoptar um equilíbrio adequado entre o requisito de menor altura possível na centrifugação e a facilidade de manipulação pelo experimentador na separação das fases após a centrifugação.

▼B

5. Além disso, na definição das condições experimentais para a separação de fases solo/solução é conveniente ter em conta a possível existência de uma «pseudofase» coloidal. As partículas coloidais, de diâmetro inferior a 0,2 μm, podem apresentar um impacto considerável no mecanismo de adsorção de uma substância numa suspensão de solo. Sempre que se executa uma centrifugação do modo descrito *supra,* os colóides permanecem na fase aquosa, sendo objecto de análise juntamente com esta última. Perdem-se, pois, as informações referentes ao seu impacto.

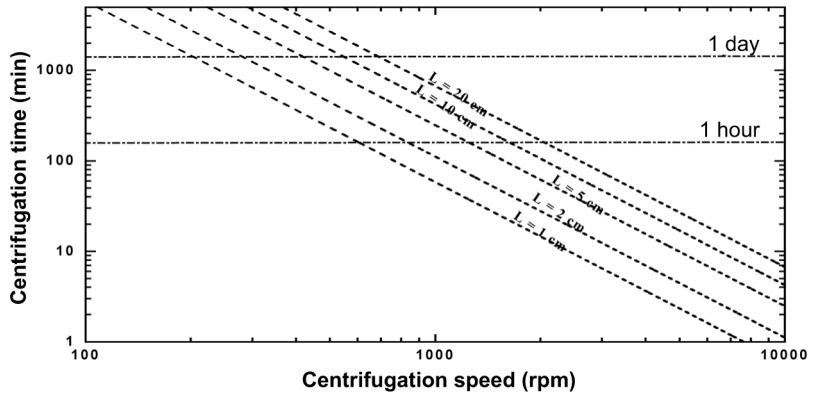
   Caso o laboratório possua condições para efectuar ultracentrifugação ou ultrafiltração, a adsorção/dessorção de uma substância no solo pode ser estudada de modo mais aprofundado, permitindo obter informações sobre a adsorção da substância nos colóides. Neste caso, deve efectuar-se uma ultracentrifugação a 60 000 rpm/minuto ou uma ultrafiltração com um filtro de 100 000 Daltons de porosidade, de modo a separar as três fases (solo, colóides, solução). O protocolo de ensaio deve também ser alterado de modo a assegurar a determinação da substância em estudo nas três fases.

Fig. 1a.



Variação do tempo de centrifugação (t) em função da velocidade de centrifugação (rpm), para solos de diversas densidades (ρ_s). R_t = 10 cm, R_b -R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3}g $s^{-1}cm^{-1}$ e ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3} a 25 °C.

Fig. lb.



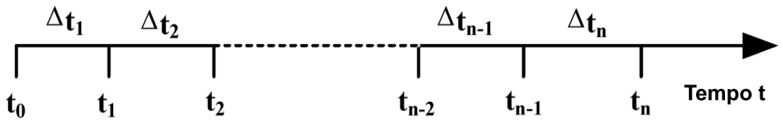
Variação do tempo de centrifugação (t) em função da velocidade de centrifugação (rpm) para diversas alturas da mistura nos tubos de ensaio ($R_|$,-$R_,$) - L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3}g $s^{-1}cm^{-1}$, ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3} a 25 °C e ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

Apêndice 5

CÁLCULO DA ADSORÇÃO A (%) E DA DESSORÇÃO D (%)

O esquema cronológico do ensaio é o seguinte:



Em todos os cálculos, presume-se que a substância de ensaio é estável e não exibe uma adsorção significativa nas paredes do recipiente.

ADSORÇÃO A (A %)

a) *Método paralelo*

Para cada tubo de ensaio (i), a percentagem de adsorção em cada instante (t_j) é calculada de acordo com a equação:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Os termos da equação podem ser calculados do seguinte modo:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

em que:

A_{t_i} = percentagem de adsorção (%) no instante t_j;

$m_s^{ads}(t_i)$ = massa da substância em estudo presente no solo no instante t_j em que a análise é efectuada (µg)

m_0 = massa da substância em estudo presente no tubo de ensaio no início do mesmo (µg)

C_0 = concentração ponderal inicial da solução em contacto com o solo (µg cm^{-3})

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = concentração ponderal da substância na fase aquosa no instante t_i em que a análise é efectuada (μg cm^{-3}): a determinação analítica desta concentração tem em conta os valores obtidos nos ensaios em branco.

V_0 = volume inicial de solução em contacto com o solo (cm^3).

Os valores relativos à percentagem de adsorção A_{t_i} ou $C_{aq}^{ads}(t_i)$ são representados graficamente em função do tempo, determinando-se o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio. As figuras 1 e 2, respectivamente, fornecem exemplos das representações em causa.

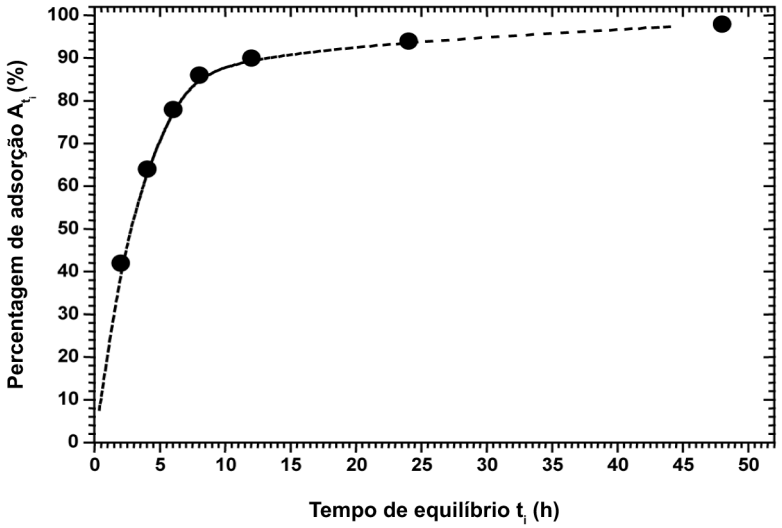


Figura 1.

Representação gráfica do equilíbrio de adsorção

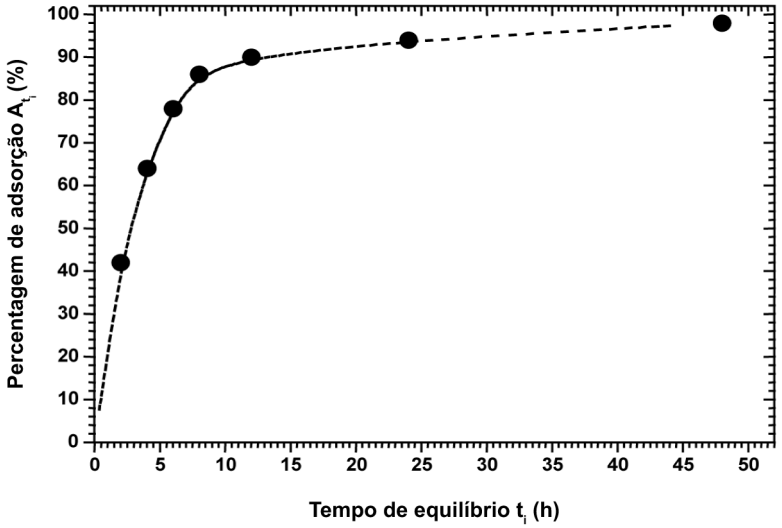


Fig. 2.

Concentraçào mássica da substáncia em estudo na fase aquosa (C_{aq}) em funçào do tempo

▼B

b) *Método sequencial*

As equações que se seguem têm em consideração o facto de o ensaio de adsorção se basear em determinações da substância em estudo em pequenas alíquotas da fase aquosa, a intervalos específicos.

— A quantidades de substância adsorvida no solo em cada intervalo é calculada do seguinte modo:

— princiro intervalo $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \frac{V_0}{v_a^A} \tag{4}$$

— segundo intervalo $\Delta t2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \frac{V_0}{v_a^A} - m_m^{ads}(t_2) \cdot \frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \tag{5}$$

— terceiro intervalo $\Delta t3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} - m_m^{ads}(t_3) \cdot \frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \tag{6}$$

— enésimo intervalo $\Delta tn = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A}\right) \tag{7}$$

— A percentagem de adsorção em cada intervalo, $A_{\Delta t_i}$, é calculada por recurso à seguinte equação:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100(\%) \tag{8}$$

enquanto que a percentagem de adsorção (A_{t_i}) no instante t_i é dada por:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \tag{9}$$

Os valores correspondentes à adsorção, A_{t_i} ou $A_{\Delta t_i}$ (de acordo com o objectivo do estudo) são representados graficamente em função do tempo, determinando-se o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio.

— No instante de equilíbrio t_{eq}:

— a massa de substância em estudo adsorvida no solo é dada por:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \tag{10}$$

▼B

— a massa de substância em estudo na solução é dada por:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— a percentagem de adsorção no estado de equilíbrio é calculada com base na equação:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Os parâmetros utilizados são definidos do seguinte modo:

$m_s^{ads}(\Delta t_1),\ m_s^{ads}(\Delta t_2),\ ...,\ m_s^{ads}(\Delta t_n)$	=	massa de substância adsorvida no solo nos intervalos Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} respectivamente (μg);
$m_m^{ads}(t_1),\ m_m^{ads}(t_2),\ ...,\ m_n^{ads}(t_n)$	=	massa de substância em estudo determinada numa alíquota $m_s^{ads}(eq)$ nos intervalos t_1, t_2,t_n respectivamente (μg);
$m_s^{ads}(eq)$	=	massa de substância adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção (μg);
$m_{aq}^{ads}(eq)$	=	massa de substância presente na solução no estado de equilíbrio de adsorção (μg);
v_a^A	=	volume da alíquota em que se determina a substância em estudo (cm^3);
$A_{\Delta t_i}$	=	percentagem de adsorção correspondente ao intervalo Δt_i (%);
A_{eq}	=	percentagem de adsorção no estado de equilíbrio de adsorção (%).

DESSORÇÃO D (%)

Considera-se que o ensaio de cinética de dessorção tem início no instante t_0 em que o volume máximo recuperado da solução da substância em estudo (após atingir o equilíbrio de adsorção) é substituído pelo mesmo volume de solução de $CaCl_2$, 0,01 M.

a) *Método paralelo*

Num determinado instante t_i, determina-se a massa da substância em estudo presente na fase aquosa recolhida do tubo i $\left(V_r^i\right)$, calculando-se a massa dessorvida de acordo com a equação:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \frac{V_0}{v_r^i} - m_{aq}^A \quad (13)$$

No estado de equilíbrio de dessorção, $t_i = t_{eq}$ e, portanto, $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

A massa de substância em estudo dessorvida no intervalo At_i é dada pela equação:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

A percentagem de dessorção é calculada do seguinte modo:

num instante t_i, com base na equação:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{15}$$

num intervalo At_i, com base na equação:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{16}$$

em que:

D_{t_i} = percentagem de dessorção no instante t_i (%);

$D_{\Delta t_i}$ = percentagem de dessorção correspondente ao intervalo Δt_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = massa de substância em estudo dessorvida no instante t_i, (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = massa de substância em estudo dessorvida no intervalo Δt_i (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = massa de substância em estudo determinada analiticamente no instante t_i num volume V_r^i,de solução recolhida para análise (μg);

m_{aq}^{A} = massa de substância em estudo excluída do equilíbrio de adsorção devido a substituição incompleta de volumes (μg).

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \tag{17}$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa de substância em estudo presente na soluçào no estado equilíbrio de adsorçào (μg).

V_R = volume de sobrenadante removido do tubo depois de atingido o estado de equilíbrio de adsorçào e substituído pelo mesmo de soluçào de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3):

V_r^i = volume de soluçào recolhido do tubo (i) para a determinaçào da substância em estudo, no ensaio de cinética de dessorçào (cm^3)

Os valores correspondentes à dessorção D_{t^i} or $D_{\Delta t^i}$ (de acordo com o objectivo do estudo) são representados graficamente em função do tempo, determinando-se o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio.

b) *Método sequencial*

As equações que se seguem têm em consideração o facto de o ensaio de adsorção precedente se basear em determinações da substância em estudo em pequenas alíquotas ((v_a^A)) da fase aquosa (método sequencial descrito na secção 1.9. «Realização do ensaio»). Presume-se que: a) o volume de sobrenadante removido do tubo na sequência do ensaio de cinética de adsorção foi substituído pelo mesmo volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M (V_R); e b) o volume total da fase aquosa em contacto com o solo (V_T) durante o ensaio de cinética de dessorção permanece constante, sendo dado pela equação:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \tag{18}$$

▼B

Num determinado instante t_i:

— Determina-se a massa da substância em estudo presente numa pequena alíquota ((v_a^D)), calculando-se a massa dessorvida de acordo com a equação:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \tag{19}$$

— No estado de equilíbrio de dessorção $t_i = t_{eq}$ e, portanto, $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— A percentagem de dessorção D_{t_i} é calculada por recurso à equação:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{20}$$

Num intervalo (Δt_i):

A quantidade de substância dessorvida em cada intervalo é calculada do seguinte modo:

— primeiro intervalo $\Delta t_i = t_1\text{-}t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \frac{V_T}{v_a^D} - m_{aq}^A \quad \text{and} \quad m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \tag{21}$$

— segundo intervalo $\Delta t_i = t_2\text{-}t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \frac{V_T}{v_a^D} - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) \text{ and}$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \tag{22}$$

— enésimo intervalo $\Delta t_n = t_n\text{-}t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D\right)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \tag{23}$$

and

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Por fim, a percentagem de dessorção em cada intervalo, $D_{\Delta t_i}$, é calculada por recurso à seguinte equação:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{24}$$

enquanto que a percentagem de dessorção D_{t_i} no instante t_i é dada por:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{25}$$

▼B

os parâmetros supra são definidos do seguinte modo:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = massa de substância que permanece adsorvida no solo nos intervalos Δt_1, Δt_2,..., Δt_n respectivamente (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = massa de substância em estudo dessorvida nos intervalos Δt_1, Δt_2,..., Δt_n respectivamente (μg);

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = massa de substância determinada numa alíquota (v_a^D) nos instantes t_1,t_2,..., t_n, respectivamente (μg);

V_T = volume total da fase aquosa em contacto com o solo durante o ensaio de cinética de dessorção efectuado pelo método sequencial (cm^3);

m_{aq}^A = massa de substância em estudo excluído do equilíbrio de adsorção devido a substituição incompleta de volumes (μg)

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = volume de sobrenadante removido do tubo após atingir o estado de equilíbrio de adsorção e substituído pelo mesmo volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3)

v_a^D = volume da alíquota recolhida do tubo para fins analíticos (i), durante o ensaio de cinética de dessorção efectuado pelo método sequencial (cm^3);

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

Apêndice 6

ADSORÇÃO-DESSORÇÃO EM SOLOS: FICHA DE APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca do solo (105 ºC, 12 h): ..... %

Temperatura: ºC

Adequabilidade do método analítico

Massa da amostra de solo	g	
Massa seca de solo	g	
Volume de solução de $CaCl_2$	cm^3	
Concentração nominal final da solução	$\mu g\ cm^{-3}$	
Concentração analítica final da solução	$\mu g\ cm^{-3}$	

Princípio do método analítico utilizado:

Calibração do método analítico:

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca do solo (105 ºC, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... ºC

Metodologia analítica adoptada: Método indirecto ☐ Método paralelo ☐ Método sequencial ☐ Método directo ☐

Ensaio de adsorção: amostras

	Símbolo	Unidades	Tempo necessário para atingir o equilíbrio		Tempo necessário para atingir o equilíbrio		Tempo necessário para atingir o equilíbrio		Tempo necessário para atingir o equilíbrio	
Tubo n.º										
Solo: massa determinada	—	g								
Solo: massa seca	m_{solo}	g								
Volume calculado de humidade no solo	V_{ws}	cm^3								
Volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M necessário para equilibrar o solo		cm^3								
Volume de solução-mãe		cm^3								
Volume total da fase aquosa em contacto com o solo	v_0	cm^3								
Concentração inicial da solução de ensaio	c_0	$\mu g\ cm^3$								
Massa de substância em estudo no início do ensaio	m_0	µg								

▼B

	Símbolo	Unidades	Tempo necessário para atingir o equilíbrio		Tempo necessário para atingir o equilíbrio		Tempo necessário para atingir o equilíbrio		Tempo necessário para atingir o equilíbrio	
Após agitação e centrifugação										
MÉTODO INDIRECTO										
Método paralelo										
Concentração da substância em estudo na fase aquosa, incluindo d correcção decorrente do ensaio em branco	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Método sequencial										
Massa de substância em estudo determinada na alíquota V^{A}_{a}	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
MÉTODO DIRECTO										
Massa da substância em estudo adsorvida no solo	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Cálculo da adsorção										
Adsorção	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Método										
Coeficiente de adsorção	K_d	$cm^3\ g^{-1}$								
Método										
Coeficiente de adsorção	K_{oc}	$cm^3\ g^{-1}$								
Método										

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca de solo (105 ºC, 1 2 h): ..... %

Temperatura: ..... ºC

Adsorção: ensaios em branco e de controlo

	Símbolo	Unidades	Branco		Branco		Controlo	
Tubo n.º								
Massa da amostra de solo		g					0	0
Teor de humidade calculado no solo		cm^3					—	—
Volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M adicionado		cm^3						
Volume de solução-mãe da substância em estudo adicionado		cm^3	0	0				
Volume total da fase aquosa (calculado)		cm^3					—	—

▼B

	Símbolo	Unidades	Branco		Branco		Controlo	
Concentração inicial da substância em estudo na fase aquosa		$\mu g\ cm^{-3}$						
Após agitação e centrifugação								
Concentração da fase aquosa		$\mu g\ cm^{-3}$						

Nota: Aditar colunas suplementares, se necessário.

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca do solo (105 ºC, 1 2 h): %

Temperatura: ºC

Balanço de massas

	Símbolo	Unidades				
Tubo n.º						
Massa da amostra de solo	—	g				
Massa seca de solo	m_{solo}	g				
Volume de água calculado no solo	V_{WS}	ml				
Volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M necessário para equilibrar o solo		ml				
Volume de solução-mãe		cm^3				
Volume total de fase aquosa em contacto com o solo	v_0	cm^3				
Concentração inicial da solução de ensaio	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$				
Tempo necessário para atingir o equilíbrio	—	h				
Após agitação e centrifugação						
Concentração da substância em estudo na fase aquosa no estado de equilíbrio de adsorção, incluindo a correcção decorrente do ensaio em branco	$C_{aq}^{ads}(eq)$	$\mu g\ cm^3$				
Tempo necessário para atingir o equilíbrio	t_{eq}	h				
Primeira diluição com solvente						
Volume de fase aquosa removido	V_{rec}	cm^3				
Volume de solvente adicionado	ΔV	cm^3				
Primeira extracção com solvente						
Intensidade do sinal do detector (solvente)	s_{EI}	var.				
Concentração da substância em estudo no solvente	C_{EI}	$\mu g\ cm^{-3}$				

▼B

	Símbolo	Unidades				
Massa de substância extraída do solo e das paredes do recipiente	m_{E1}	µg				
Segunda diluição com solvente com solvente						
Volume de solvente removido	ΔV_s	cm^3				
Volume de solvente adicionado	$\Delta V'$	cm^3				
Segunda extracção com solvente						
intensidade do sinal do detector (solvente)	S_{E2}	var.				
Concentração da substância em estudo no solvente	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Massa de substância extraída do solo e das paredes do recipiente	m_{E2}	µg				
Massa total de substância em estudo extraída nas duas etapas	m_E	µg				
Balanço de massas	MB	%				

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca de solo (105 ºC, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... ºC

Isotérmicas de adsorção

	Símbolo	Unidades								
Tubo n.º										
Massa da amostra de solo	—	g								
Massa seca de solo	E	g								
Volume de água calculado no solo	V_{ws}	cm^3								
Volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M necessário para equilibrar o solo		cm^3								
Volume de solução-mãe adicionado		cm^3								
Volume total de fase aquosa em contacto com o solo (calculado)	v_0	cm^3								
Concentração da solução	C_0	µg cm^3								
Tempo necessário para atingir o equilíbrio	—	h								

▼B

	Símbolo	Unidades								
Após agitação e centrifugação										
Concentração da substância na fase aquosa, incluindo a correcção decorrente do ensaio em branco	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Temperatura		°C								
Massa adsorvida por unidade de solo	$C_s^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Análise por regressão linear:

valor de KK_F^{ads}:

valor de l/n:

coeficiente de regressão r^2:

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca do solo (105 °C, 1 2 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Metodologia analítica adoptada: Método indirecto ☐ Método paralelo ☐ Método sequencial ☐

Ensaio de dessorção

		Símbolo	Unidades	Intervalo	Intervalo	Intervalo	Intervalo
Número do tubo no ensaio de adsorção							
Massa de substância adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Volume de fase aquosa removido e substituído por solução de $CaCl_2$ 0,01 M		V_R	cm^3				
Volume total de fase aquosa em contacto com o solo	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Massa de substância em estudo excluída do equilíbrio de adsorção devido a substituição incompleta de volumes		m_{aq}^A	µg				
Cinética de dessorção							
Massa determinada de substância dessorvida do solo no instante t_i		$m_m^{ads}(t_i)$	µg				
Volume de solução recolhida do tubo (i) para determinação da substância em estudo	PM	V_f^i	cm^3				
	SM	$v_a{}^A$	cm^3				
Massa de substância dessorvida do solo no instante t_i (calculada)		$m_{aq}^{ads}(t_i)$	µg				
Massa de substância dessorvida do solo no intervalo Δt_i (calculada)		$m_{aq}^{ads}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Símbolo	Unidades	Intervalo	Intervalo	Intervalo	Intervalo
Percentagem de dessorção						
Dessorção no instante t_i	D_{ti}	%				
Dessorção no intervalo Δt_i	$D_{\Delta ti}$	%				
Coeficiente de dessorção aparente	K_{des}					

PM: Método paralelo

SM: Método sequencial

▼B

C.19. ESTIMATIVA DO VALOR DO COEFICIENTE DE ADSORÇÃO (K_{OC}) EM SOLOS E EM LAMAS DE DEPURAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 121 (2000) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

O comportamento absortivo e/ou adsortivo das substâncias presentes em solos ou lamas de depuração pode ser descrito por meio de parâmetros determinados experimentalmente, através do método de ensaio C 18. O coeficiente de adsorção é um parâmetro importante, definido como a razão entre a concentração da substância no solo/-lamas e a concentração da substância na fase aquosa, em condições de equilíbrio de adsorção. O coeficiente de adsorção normalizado para o teor de carbono orgânico no solo (K_{oc}), é um indicador útil da capacidade de ligação de um composto químico à matéria orgânica presente no solo e nas lamas de depuração, permitindo que se estabeleçam comparações entre os diferentes compostos químicos. Este parâmetro pode ser estimado através de correlações com a solubilidade em água e com o coeficiente de partição n-octanol/água (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

O método experimental descrito no presente ensaio utiliza a técnica HPLC para estimar o coeficiente de adsorção K_{oc} em solos e em lamas de depuração (8). Os valores estimados são mais fiáveis que os obtidos através do método de cálculos QSAR («quantitative structure-activity relationships», relações quantitativas estrutura/-actividade) (9). Por se tratar de um método estimativo, o presente método experimental não pode substituir completamente as experiências em reactor descontínuo que são utilizadas no método de ensaios C l8. No entanto, o valor estimado para K_{oc} pode ser útil na escolha dos parâmetros de ensaio adequados para estudos de adsorção/-dessorção de acordo com o método de ensaios C l8, através do cálculo de K_d (coeficiente de distribuição) ou de K_l (coeficiente de adsorção de Freundlich), segundo a equação 3 (ver ponto 1.2).

1.2. DEFINIÇÕES

K_d: coeficiente de distribuição. Este coeficiente é definido como a razão entre as concentrações de equilíbrio (C), de uma substância de ensaio dissolvida num sistema bifásico constituído por um componente com comportamento absortivo e/ou adsortivo (solo ou lamas de depuração) e uma fase aquosa. Esta grandeza é adimensional quando as concentrações em ambas as fases são expressas em peso/-peso. No caso da concentração da fase aquosa ser expressa em peso/volume, as unidades utilizadas são $ml.g^{-1}$. O valor de K_d pode variar com as propriedades do componente com comportamento absortivo e/ou adsortivo, assim como depender da sua concentração.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} or \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \quad (1)$$

em que:

C_{solo} = concentração da substância de ensaio no solo, no equilíbrio ($\mu g \cdot g^{-1}$)

C_{lamas} = concentração da substância de ensaio nas lamas, no equilíbrio, ($\mu g \cdot g^{-1}$)

C_{aq} = concentração da substância de ensaio na fase aquosa, no equilíbrio ($\mu g \cdot g^{-1}$, $\mu g \cdot ml^{-1}$).

▼B

K_f: coeficiente de adsorção de Freundlich. Este coeficiente é definido como a concentração da substância de ensaio no solo ou nas lamas de depuração (x/m) quando a concentração de equilíbrio na fase aquosa (C_{aq}) é igual a um. Esta grandeza é expressa em $\mu g \cdot g^{-1}$ de componente com comportamento absortivo e/ou adsortivo. O valor de K_f pode ser afectado pelas propriedades desse componente.

$$\log\frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n}\cdot\log C_{aq} \quad (2)$$

em que:

x/m = quantidade da substância de ensaio x (μg) adsorvida numa quantidade m (g) de componente com comportamento absortivo e/ou adsortivo, no equilíbrio

l/n = declive da isotérmica de adsorção de Freundlich

C_{aq} = concentração da substância de ensaio na fase aquosa, no equilíbrio ($\mu g \cdot ml^{-1}$)

$$\text{At } C_{aq} = 1; \log K_f = \log\frac{x}{m}$$

K_{oc}: coeficiente de distribuição (K_d) ou coeficiente de adsorção de Freundlich (K_f) normalizados para o teor de carbono orgânico (f_{oc}), de um componente com comportamento absortivo e/ou adsortivo. Esta grandeza é um indicador adequado do grau de adsorção entre a substância e o componente com comportamento absortivo e/ou adsortivo, principalmente no caso de compostos químicos não ionizados, permitindo que sejam feitas comparações entre diferentes compostos químicos. Dependendo das unidades de K_d ou de K_f, o K_{oc} pode ser adimensional ou expresso em $ml \cdot g^{-1}$ or $\mu g \cdot g^{-1}$ de matéria orgânica:

$$Koc = \frac{Kd}{foc}(\text{adimensional ou } ml\cdot g^{-1}) \text{or} \frac{Kf}{foc}(\mu g\cdot g^{-1}) \quad (3)$$

Embora a relação entre K_{oc} e K_d não seja sempre linear, pelo que os valores de K_{oc} podem variar de solo para solo, esta variabilidade é significativamente reduzida comparativamente à registada para os valores de K_d ou K_f,

O coeficiente de adsorção (K_{oc}) é deduzido a partir do factor de capacidade (k^1), utilizando uma curva de calibração de log k^1 em função de log K_{oc} dos compostos de referência seleccionados.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

em que:

t_R = tempo de retenção em HPLC da substância de ensaio e da substância de referência (em minutos)

t_0 = tempo-limite em HPLC (minutos) (ver ponto 1.8.2).

P_{OW}: coeficiente de partição octanol-água. Este coeficiente define-se como a razão entre as concentrações da substância dissolvida em n-octanol e em água. Trata-se de uma grandeza adimensional

$$Pow = \frac{Coctanol}{Caq}(= Kow) \quad (5)$$

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Antes da utilização do método, é necessário conhecer a fórmula estrutural, o grau de pureza e a constante de dissociação (caso seja adequado). Será útil dispor de informações relativas à solubilidade em água e em solventes orgânicos, ao coeficiente de partição octanol-água e às características de hidrólise.

▼B

De forma a correlacionar os valores de retenção, medidos em HPLC, de uma substância de ensaio com o seu coeficiente de adsorção, K_{oc}, deverá ser traçada uma curva de calibração de log K_{oc} em função de log k[1]. Deverão ser utilizados, no mínimo, seis valores de referência, dos quais pelo menos um deverá estar acima e outro abaixo do valor esperado para a substância de ensaio. O grau de exactidão do método será melhorado significativamente se forem utilizadas substâncias de referência estruturalmente relacionadas com a substância de ensaio. Caso estes dados não estejam disponíveis, cabe ao analista seleccionar as substâncias de calibração adequadas. Nesse caso, deverá ser escolhido um conjunto mais abrangente de substâncias, estruturalmente heterogéneas. Nas tabelas 1 e 3 do apêndice apresentam-se listas das substâncias e valores de K_{oc} que podem ser utilizados para as lamas de depuração e para os solos, respectivamente. A selecção de outras substâncias de calibração deverá ser devidamente justificada.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O HPLC é realizado em colunas analíticas com enchimento de cianopropilo comercial em fase sólida contendo grupos lipofílicos e grupos polares. E utilizada uma fase estacionária com polaridade moderada baseada numa matriz de sílica.

– O – Sí	$–CH_2 –CH_2 –CH_2$	–CN
sílica	espaçador apolar	grupo polar

O princípio do método de ensaio é semelhante ao utilizado no método de ensaio A.8 (coeficiente de partição, método de HPLC). A substância de ensaio interage com a fase estacionária ao passar pela coluna juntamente com a fase móvel, sendo retardada em resultado da partição entre as fases móvel e estacionária. A composição mista da fase estacionária, que contém grupos polares e grupos apoiares, permite que a interacção dos grupos polares e apoiares de determinada molécula ocorra de forma semelhante à que se verifica com a matéria orgânica em matrizes de solo ou de lamas de depuração, possibilitando o estabelecimento de uma relação entre o tempo de retenção na coluna e o coeficiente de adsorção à matéria orgânica.

O pH tem uma influência significativa no comportamento absortivo e/ou adsortivo, sobretudo no caso de substâncias polares. Em solos agrícolas ou em tanques de estações de tratamento de águas residuais, o pH varia normalmente entre 5,5 e 7,5. Relativamente a substâncias ionizáveis, deverão ser efectuados dois ensaios, um com a forma ionizada e outro com a forma não ionizada em soluções tampão adequadas, apenas nos casos em que pelo menos 10 % do composto de ensaio se encontre dissociado a pH entre 5,5 e 7,5.

Uma vez que, para avaliar os resultados, utiliza-se apenas a relação entre a retenção na coluna de HPLC e o coeficiente de adsorção, não é necessário utilizar qualquer método quantitativo, determinar o tempo de retenção. Caso se disponha de um conjunto adequado de substâncias de referência e estejam estabelecidas condições experimentais-padrão, o presente método constitui um modo rápido e eficaz para estimar o valor do coeficiente de adsorção K_{oc}.

1.5. APLICABILIDADE DO ENSAIO

O método de HPLC é aplicável a substâncias químicas (marcadas ou não) para as quais exista um sistema de detecção adequado (por exemplo, espectrofotómetro, detector de radioactividade) e que sejam suficientemente estáveis durante o período de ensaio. O método pode ser particularmente útil no caso de produtos químicos que sejam difíceis de estudar com outros sistemas experimentais (ou seja, substâncias voláteis, substâncias que não são solúveis em água em concentrações que possam ser determinadas analiticamente, substâncias que apresentem uma elevada afinidade para a superfície dos sistemas de incubação). O método pode ser utilizado para misturas que apresentam bandas de eluição não resolvidas. Nesse caso, devem ser referidos os limites superior e inferior dos valores de log K_{oc} dos compostos presentes na mistura de ensaio.

▼B

As impurezas podem por vezes representar um problema para a interpretação dos resultados de HPLC. No entanto, a sua influência pode ser minimizada se a substância de ensaio puder ser inequivocamente identificada pelo método analítico e separada das impurezas.

O presente método encontra-se validado para as substâncias descritas na tabela 1 do apêndice, tendo sido igualmente aplicado a uma série de outros compostos químicos pertencentes às seguintes famílias de compostos:

— aminas aromáticas (por exemplo, trifluralina, 4-cloroanilina, 3,5--dinitroanilina, 4-metilanilina, N-metilanilina, l-naftilamina),

— ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos (por exemplo, éster metílico do ácido benzóico, éster etílico do ácido 3,5-dinitrobenzóico),

— hidrocarbonetos aromáticos (por exemplo, tolueno, xileno, etilbenzeno, nitrobenzeno),

— ésteres do ácido ariloxifenoxipropiónico (por exemplo, diclofop--metilo, fenoxaprop-etilo, fenoxaprop-P-etilo),

— fungicidas benzimidazólicos e imidazólicos (por exemplo, carbendazim, fuberidazol, triazóxido),

— amidas de ácidos carboxílicos (por exemplo, 2-clorobenzamida, N,N-dimetilbenzamida, 3,5-dinitrobenzamida, N-metilbenzamida, 2-nitrobenzamida, 3-nitrobenzamida),

— hidrocarbonetos clorados (por exemplo, endosulfan, DDT, hexaclorobenzeno, quintozeno, 1.2.3-triclorobenzeno),

— insecticidas organo-fosforados (por exemplo, azinfos-metilo, dissulfotão, fenamifos, isofenfos, pirazofos, sulprofos, triazofos),

— fenóis (por exemplo, fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 1-naftol),

— derivados da fenilureia (por exemplo, isoproturão, monolinurão, pencicurão),

— corantes (por exemplo, Amarelo Acido 219, Azul Básico 41, Vermelho Directo 81),

— hidrocarbonetos poliaromáticos (por exemplo, acenafteno, naftaleno),

— herbicidas do tipo 1,3,5-triazina (por exemplo, prometrino, propazina, simazina, terbutrina),

— derivados de triazole (por exemplo, tebuconazole, triadimefona, tradimenol, triapentenol).

O presente método não é aplicável a substâncias que reajam com o eluente ou com a fase estacionária nem a substâncias que interajam de forma específica com componentes inorgânicos (por exemplo, formação de agregados de complexos com minerais argilosos). O presente método pode não ser adequado para a análise de surfactantes, compostos inorgânicos ou ácidos e bases moderadamente fortes ou fortes. O presente método permite determinar valores de log K_{oc} entre 1,5 e 5,0. Na medição de substâncias ionizáveis deve utilizar-se uma fase móvel tamponada, sendo necessário tomar precauções de modo a evitar a precipitação dos componentes do tampão ou da substância de ensaio.

▼B

1.6. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.6.1. **Exactidão**

De um modo geral, o coeficiente de adsorção de uma substância de ensaio pode ser estimado com uma margem de erro de ± 0,5 unidades de logaritmo, relativamente ao valor determinado em reactor descontínuo (ver tabela 1 do apêndice). Poderá obter-se um grau de exactidão superior se se utilizarem substâncias de referência estruturalmente relacionadas com a substância de ensaio.

1.6.2. **Repetitividade**

Cada determinação deve ser feita pelo menos em duplicado. Os valores de log K_{oc} obtidos em cada medição devem encontrar-se numa gama de 0,25 unidades de logaritmo.

1.6.3. **Reprodutibilidade**

A experiência obtida até ao momento com a aplicação do presente método suporta a sua validade. Numa análise do método de HPLC, realizada com 48 substâncias (pesticidas, na sua maior parte) relativamente às quais existiam valores fiáveis de K_{oc} em solos, o coeficiente de correlação obtido foi de R = 0,95 (10) (11).

De modo a melhorar e validar o presente método, foi efectuado um ensaio comparativo interlaboratorial no qual participaram 11 laboratórios (12). Os resultados desse ensaio são apresentados na tabela 2 do apêndice.

1.7. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.7.1. **Estimativa preliminar do coeficiente de adsorção**

O coeficiente de partição octanol-água P_{ow} (= K_{ow}), assim como, em certa medida, a solubilidade em água, podem ser utilizados como indicadores da extensão da adsorção, em particular para substâncias não ionizáveis, podendo assim ser utilizados numa primeira aproximação com vista a determinar a gama de variação do valor do coeficiente de adsorção. Relativamente a vários grupos de compostos químicos. Têm sido publicadas uma série de correlações úteis relativamente a vários grupos de compostos químicos (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Equipamento**

É necessário um cromatógrafo de fase líquida equipado com uma bomba de pulsação livre e um equipamento de detecção adequado. Recomenda-se a utilização de uma válvula de injecção com ciclos de injecção. Deverão ser utilizadas resinas comerciais de cianopropilo quimicamente ligado a uma base de sílica (por exemplo, Hypersil e Zorbax CN). Poderá interpor-se uma coluna de protecção do mesmo material entre o sistema de injecção e a coluna analítica. A eficiência de separação das colunas poderá variar substancialmente em função do fabricante. Como referência, relativamente aos factores de capacidade k' deverão ser atingidas os seguintes valores: log k' > 0,0 para log K_{oc} = 3,0 e log k' > 0,4 para log K_{oc} = 2,0, quando se utiliza uma fase móvel de metanol/água nas proporções de 55/45 %.

1.7.3. **Fases móveis**

Foram ensaiadas diversas fases móveis, sendo recomendadas as duas seguintes:

— metanol/água (55/45 % v/v),

— metanol/0,01 M tampão citrato pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

Na preparação do solvente de eluição, deve utilizar-se metanol com grau de pureza para HPLC e água destilada ou tampão citrato. Os gases da mistura devem ser eliminados antes da sua utilização. Deve utilizar-se uma eluição isocrática. Se o uso de misturas metanol/água não for apropriado, pode tentar utilizar-se outras misturas água/solventes orgânicos como, por exemplo, etanol/água ou acetonitrilo/água. Para compostos ionizáveis, é recomendada a utilização da solução tampão, de modo a estabilizar o pH. Deverão tomar-se precauções para evitar a precipitação de sais e a deterioração da coluna, que podem ocorrer com algumas misturas de fase orgânica/tampão.

Não devem ser utilizados aditivos, como reagentes de pares iónicos, uma vez que estes podem afectar as propriedades absortivas e/ou adsortivas da fase estacionária, de uma forma que poderá ser irreversível. É por esta razão obrigatório que os ensaios com aditivos sejam realizados em colunas separadas do mesmo tipo.

1.7.4. **Solutos**

Tanto as substâncias de ensaio como as de referência devem ser dissolvidas na fase móvel.

1.8. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1.8.1. **Condições de ensaio**

Deve ser registada a temperatura à qual se efectuam as medidas. É fortemente recomendada a utilização de um compartimento de colunas com controlo de temperatura, de modo a garantir condições de temperatura constante durante a calibração, de avaliação prévia e das medições da substância de ensaio.

1.8.2. **Determinação do tempo limite t_o**

Podem ser utilizados dois métodos diferentes na determinação do tempo limite t_o (ver também ponto 1.2).

1.8.2.1. *Determinação do tempo limite t_o através de uma série homóloga*

Este procedimento provou dar origem a valores de t_o fiáveis e padronizados. Pormenores sobre este método podem ser encontrados no método de ensaio A.8: coeficiente de partição (n-octanol/água), método de HPLC.

1.8.2.2. *Determinação do tempo limite t_0 através de substâncias inerte que não são retidas pela coluna*

Esta técnica baseia-se na injecção de soluções de formamida, ureia ou nitrato de sódio. As medições devem ser feitas, peio menos, em duplicado.

1.8.3. **Determinação dos tempos de retenção t_R**

As substâncias de referência devem ser seleccionadas de acordo com o procedimento descrito no ponto 1.3. Para determinar os respectivos tempos de retenção, podem ser injectadas misturadas desde que se tenha confirmado que o tempo de retenção de cada um dos padrões não é afectado pela presença dos outros padrões. A calibração deve ser efectuada a intervalos regulares, pelo menos duas vezes por dia, de modo a poder detectar quaisquer alterações inesperadas no comportamento da coluna. Para uma boa prática laboratorial, as injecções de calibração devem ser efectuadas antes e depois da injecção da substância de ensaio, de modo a confirmar se não houve alterações nos tempos de retenção. As substâncias de ensaio são injectadas separadamente, em quantidades o mais reduzidas possível (de modo a evitar a sobrecarga da coluna), e determinados os seus tempos de retenção.

▼B

Para aumentar o grau de confiança das medições, as determinações devem ser feitas pelo menos em duplicado. Os valores de log K_{oc} obtidos em cada medição devem manter-se numa gama de 0,25 unidades de logaritmo.

1.8.4. **Avaliação**

Os factores de capacidade k' são calculados a partir do tempo limite t_o e dos tempos de retenção t_R das substâncias de referência seleccionadas, de acordo com a equação 4 (ver ponto 1.2) Os valores de log k' das substâncias de referência são em seguida representados graficamente em função dos respectivos valores de log K_{oc}, obtidos nos ensaios em reactor descontínuo fornecidos nas tabelas 1 e 3 do apêndice. Através deste gráfico, o valor de log k' de uma substância de ensaio é então utilizado para determinar o seu valor de log K_{oc}. Se os resultados obtidos revelarem que o valor de log K_{oc} da substância de ensaio se encontra fora da curva de calibração, o ensaio deve ser repetido com outras substâncias de referência, mais adequadas.

2. **DADOS E RELATÓRIO**

O relatório deve incluir a seguinte informação:

— a identidade das substâncias de ensaio e de referência, e o seu grau de pureza e, se relevante, os respectivos valores de pK_a,

— a descrição do equipamento e das condições de funcionamento, por exmplo, o tipo e a dimensão da coluna analítica (e da coluna de protecção), os meios de detecção, a fase móvel (composição relativa e pH), a gama de temperaturas observadas durante o decorrer das medições,

— o tempo limite e o método utilizado para a sua determinação,

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

— os tempos de retenção dos compostos de referência utilizados para a calibração,

— as características da regressão linear dos pontos experimentais (log k' em função de log K_{oc}) e um gráfico da recta obtida por regressão linear,

— os dados sobre o tempo médio de retenção e o valor estimado para log K_{oc} do composto de ensaio,

— cromatogramas.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1-67.

(3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, p. 1050-1059.

(4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, p. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, p. 297-312.

▼B

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, p. 831-832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, p. 833-846.

(8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), p. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), p. 2493-2504.

(10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil--comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27-(12), p. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, p. 28 5-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (199 5). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), p. 1373-1384.

▼B

Apêndice

Tabela 1

Comparação entre os valores de K_{oc} para solos e lamas de depuração e os valores calculados pelo método de HPLC ([1]), ([2])

Substância	Número CAS	Log K_{OC} lamas de depuração	Log K_{OC} HPLC	A	Log K_{OC} solos	Log K_{OC} HPLC	A
Atrazina	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linurão	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fentião	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monurão	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantreno	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Éster fenílico do ácido benzóico	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamida	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamida	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilida	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilina	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dicloroanilina	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), p. 121-128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges.Chemosphere. 35(1/2), p. 107-119.

Tabela 2

Resultados de um ensaio comparativo interlaboratorial (11 laboratórios participantes), efectuado com o objectivo de melhorar e validar o método de HPLC ([1])

Substância	Número CAS	Log K_{OC}	K_{OC}	Log K_{OC}
		(OECD 106)	(método de HPLC)	
Atrazina	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monurão	150-68-5	1,99	100 + 8	2,00
Triapentenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linurão	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fentião	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil--results of a ring test. Chemosphere, 30(7), p. 1373-1384.

▼B

Tabela 3

Substâncias de referência recomendadas para o método de HPLC baseado em dados de adsorção em solos

Substância de referência	Número CAS	Valores médios de log K_{OC} em reactor descontínuo	Número de valores de K_{OC}	Log desvio-padrão	Fonte
Acetanilida	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-Nitrobenzamida	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N,N-dimetilbenzamida	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-Metilbenzamida	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Benzoato de metilo	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrazina	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Isoproturão	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-Nitrobenzamida	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Anilina	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-Dinitrobenzamida	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazóxido	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linurão	330-5 5-2	2,59	3	1,97	(c)
Naftaleno	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Metiocarbe	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Amarelo Ácido 21 9	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-Triclorobenzeno	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
Y-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fentião	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
Vermelho Directo 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pirazofos	1 3457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
a-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Diclofop-metilo	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Fenantreno	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Azul Básico 41 (mistura)	268 50-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(a)
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(b)

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01044 (1994).
(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, p. 285-304.
(c) Dados fornecidos por entidades industriais.

▼B

C.20. **ENSAIO SOBRE A REPRODUÇÃO DE *DAPHNIA MAGNA***

1. **MÉTODO**

Este método de ensaio de toxicidade na reprodução baseia-se na publicação OECD TG 211 (1998) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

O principal objectivo do ensaio consiste em determinar o efeito de produtos químicos sobre a produção de descendência de *Daphnia magna.*

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

Animais progenitores: as fêmeas *Daphnia* presentes no início do ensaio e cuja reprodução é o objecto do estudo.

Descendência: os juvenis *Daphnia* produzidos pelos animais progenitores no decorrer do ensaio.

Menor concentração com efeito observável (LOEC): a menor concentração testada em que a substância ensaiada produz um efeito observável estatisticamente significativo sobre a reprodução e mortalidade dos progenitores (a $p < 0,05$), comparativamente ao controlo, durante um período de exposição definido. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito nocivo igual ou superior ao verificado para a LOEC. Quando estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deverá ser fornecida uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, consequentemente, a NOEC).

Concentração sem efeito observável (NOEC): a mais elevada concentração ensaiada que, quando comparada com o controlo, não tem qualquer efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$), durante um período de exposição definido (corresponde à concentração ensaiada imediatamente abaixo da LOEC).

CE_x: a concentração da substância de ensaio dissolvida em água que provoca uma redução de x % na reprodução da *Daphnia magna,* durante um período de exposição definido.

Taxa intrínseca de crescimento: uma medida do crescimento da população que integra a produção de descendência e a mortalidade específica da idade (20) (21) (22). O seu valor será igual a zero nas populações estáveis, positivo para as populações em crescimento e negativo para populações em declínio. Manifestamente, a última situação não é sustentável c, em última análise, conduzirá à extinção.

Limite de detecção: a menor concentração que pode ser detectada, mas não quantificada.

Limite de determinação: a menor concentração que pode ser medida de forma quantitativa.

Mortalidade: um animal é considerado morto quando permanece imóvel, isto é, quando não é capaz de nadar ou quando não se observa movimento dos apêndices ou do pós-abdómen no intervalo de 15 segundos após agitação suave do recipiente de ensaio (se for utilizada outra definição, esta deve ser mencionada juntamente com a sua referência).

▼B

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

As fêmeas jovens *Daphnia* (os animais progenitores), com menos de 24 horas de vida no início do ensaio, são expostas à substância de ensaio misturada na água em diversas concentrações. A duração do ensaio é de 21 dias. No fim do ensaio, é determinado o número total de descendentes vivos produzidos por cada animal progenitor que esteja vivo. Isto significa que são excluídos dos cálculos os juvenis produzidos por adultos que morreram durante o ensaio. A produção de descendência pelos animais progenitores pode expressar-se de outras formas (por exemplo, pelo número de descendentes vivos produzidos por animal e por dia, desde o primeiro dia em que se observou descendência), mas estas devem ser descritas juntamente com o número total de juvenis produzidos por progenitor vivo no fim do ensaio. A produção de descendência pelos animais expostos â substância de ensaio é comparada com a obtida no(s) controlo(s), a fim de determinar a menor concentração com efeito observável (LOEC) e, consequentemente, a concentração sem efeito observável (NOEC). Adicionalmente, e na medida do possível, os dados são analisados utilizando um modelo de regressão de modo a estimar a concentração que causaria uma redução de x % na produção de descendência (isto é CE_{50}, CE_{20} ou CE_{10}).

É necessário registar também a sobrevivência dos animais progenitores e o tempo que decorreu até ao aparecimento dos primeiros juvenis. Podem ainda ser examinados outros efeitos relacionados com a substância, em parâmetros como o crescimento (o comprimento, por exemplo) e, possivelmente, a taxa intrínseca de crescimento.

1.4. INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA DE ENSAIO

Deverão estar disponíveis os resultados de um ensaio de toxicidade aguda (ver método C.2, parte I) realizado com a *Daphnia magna*. Estes resultados podem ser úteis para seleccionar um intervalo apropriado de concentrações a usar nos ensaios de reprodução. A solubilidade em água e a pressão de vapor da substância de ensaio deverão ser conhecidas, e deverá estar disponível um método analítico fiável para a quantificação da substância nas soluções de ensaio, relativamente ao qual esteja descrita a eficiência de recuperação e o limite de determinação.

A fórmula estrutural, o grau de pureza da substância, a estabilidade à luz, a estabilidade nas condições do ensaio, o pKa, o P_{ow} e os resultados do ensaio para a biodegradabilidade «fácil» constituem informações relativas à substância que podem ser úteis para o estabelecimento das condições do ensaio (ver método C.4).

1.5. VALIDADE DO ENSAIO

Para que um ensaio seja válido, deverão ser satisfeitos os seguintes critérios relativamente ao(s) controlo(s):

— a mortalidade dos animais progenitores (fêmea *Daphnia*) no fim do ensaio não deve exceder 20 %;

— o número médio da descendência viva, produzida por animal progenitor sobrevivente no fim do ensaio deve ser ≥ 60.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Equipamento**

Os recipientes de ensaio e outros aparelhos que entrem em contacto com as soluções de ensaio devem ser, exclusivamente, de vidro ou outro material quimicamente inerte. Os recipientes de ensaio utilizados serão, normalmente, copos de vidro.

Adicionalmente, será necessário utilizar parte ou a totalidade do seguinte equipamento:

— medidor de oxigénio (com microeléctrodo ou outro equipamento adequado para a medição de oxigénio dissolvido em amostras com volume reduzido),

▼B

— aparelhos adequados para o controlo da temperatura,

— medidor de pH,

— equipamento para a determinação da dureza da água,

— equipamento para a determinação da concentração de carbono orgânico total (COT) da água ou equipamento para a determinação da carência química de oxigénio (CQO),

— aparelho adequado para o controlo do regime de luz e a medição da intensidade da luz.

1.6.2. **Organismos de ensaio**

A espécie a ser utilizada no ensaio é a *Daphnia magna* Straus. Podem ser utilizadas outras espécies de *Daphnia,* desde que obedeçam aos critérios de validade (o critério de validade relativo à produção de descendência nos controlos deve ser aplicável à espécie de *Daphnia).* Se forem utilizadas outras espécies de *Daphnia,* estas devem ser claramente identificadas e o seu uso justificado.

É desejável que os clones tenham sido identificados, por genotipagem. A investigação já efectuada nesse domínio (1) demonstrou que a reprodução do clone A (proveniente do 1RCHA, em França) (3) obedece de forma satisfatória ao critério de validade de uma média ≥ 60 descendentes por animal progenitor sobrevivente, quando cultivado nas condições descritas no presente método. No entanto, são aceitáveis outros clones, desde que se demonstre que a cultura de *Daphnia* satisfaz os critérios de validade para o ensaio.

No início do ensaio, os animais devem ter menos de 24 horas de vida e não devem fazer parte da primeira ninhada do progenitor. Devem provir de um lote saudável [isto é, não evidenciar sinais de distúrbio, tais como elevada mortalidade, presença de machos e ovos de repouso *(ephippia),* atraso na produção da primeira ninhada, animais descorados, etc.]. O lote de animais deve ser mantido em condições de cultura (luz, temperatura, meio, alimentação e número de animais por unidade de volume) semelhantes às que irão ser utilizadas no ensaio. Se o meio de cultura da *Daphnia* a ser utilizado no ensaio for diferente do utilizado para a cultura de rotina da *Daphnia*, é boa prática incluir um período de aclimatação de cerca de três semanas antes do ensaio (isto é, uma geração) para evitar perturbações nos animais progenitores.

1.6.3. **Meio de ensaio**

E recomendada a utilização, neste ensaio, de um meio totalmente definido. Isto permite evitar o uso de aditivos (por exemplo, algas marinhas, extracto de solo, etc.), que são difíceis de caracterizar, e assim melhorar o processo de padronização entre laboratórios. Foram considerados adequados para este fim os meios Elendt M4 (4) e M7 (ver apêndice 1). São aceitáveis, no entanto, outros meios [ver, por exemplo, (5) e (6)] desde que as características da cultura de *Daphnia* satisfaçam os critérios de validade para o ensaio.

Se for utilizado um meio que inclui aditivos não definidos, estes deverão ser claramente especificados e o relatório do ensaio deverá incluir informações sobre a composição, nomeadamente no que diz respeito ao teor de carbono, já que este poderá contribuir para o alimento fornecido. Recomenda-se que o carbono orgânico total (COT) e/ou a carência química de oxigénio (CQO) da solução de reserva do aditivo orgânico sejam determinados, e feita uma estimativa da contribuição resultante para os valores COT/CQO no meio de ensaio. Recomenda-se que os níveis de COT no meio (isto é, antes da adição das algas) sejam inferiores a 2 mg/l (7).

▼B

Quando as substâncias de ensaio contêm metais, é importante reconhecer que as propriedades do meio de ensaio (por exemplo, a dureza, capacidade quelante) podem ter influência na toxicidade da substância de ensaio. Por esta razão, é desejável utilizar um meio cuja composição seja totalmente conhecida. No entanto, actualmente, os únicos meios totalmente definidos que se sabe serem adequados para a cultura a longo prazo da *Daphnia magna* são os meios Elendt M4 e M7. Ambos os meios contêm o agente quelante EDTA. Alguns estudos (2) demonstram que a toxicidade aparente do cádmio é geralmente menor quando o ensaio da reprodução é realizado em meios M4 e M7 do que quando é realizado num meio que não contém EDTA. Em consequência, os meios M4 e M7 não são recomendados para o ensaio de substâncias contendo metais, devendo igualmente ser evitados outros meios contendo agentes quelantes. Para substâncias que contenham metais, poderá ser aconselhável utilizar um meio alternativo, como, por exemplo, água dura ASTM reconstituída (7), que não contém EDTA, com adição de extracto de algas marinhas (8). Esta combinação de água dura ASTM reconstituída e extracto de algas marinhas é também adequada para culturas de longo prazo e ensaios de *Daphnia magna* (2), embora ainda exerça uma fraca acção quelante devido ao componente orgânico existente no extracto de algas marinhas adicionado.

A concentração de oxigénio dissolvido no início e ao longo do ensaio deve ser superior a 3 mg/l. O valor de pH deve estar situado entre 6 e 9 e não deve variar em nenhum ensaio mais do que 1,5 unidades. Recomenda-se uma dureza superior a 140 mg/l (como $CaCO_3$). Ensaios a este nível e superiores demonstraram que, nessas condições, a produção de descendência cumpre os critérios de validade (9) (10).

1.6.4. **Soluções de ensaio**

De um modo geral, as soluções de ensaio com as concentrações escolhidas são preparadas por diluição de uma solução de reserva. As soluções de reserva devem ser preparadas, de preferência, por dissolução da substância no meio de ensaio.

Em alguns casos, pode ser necessário recorrer a solventes orgânicos ou dispersantes de modo a produzir uma solução de reserva com uma concentração adequada, mas deverão ser feitos todos os esforços de modo a evitar a utilização de tais substâncias. A acetona, o etanol, o metanol, a dimetilformamida e o trietilenoglicol constituem exemplos de solventes adequados. Como exemplos de dispersantes adequados, podem citar-se o Cremophor RH40, a metilcelulose 0,01 % e o HCO-40. Em qualquer um dos casos, a substância de ensaio presente nas soluções nunca deve exceder o limite de solubilidade no meio de ensaio.

Utilizam-se solventes com o fim de preparar uma solução de reserva que permita o doseamento exacto da substância no meio de cultura. Na concentração recomendada para meio de ensaio final (isto é $\leq$ 0,1 ml/l), os solventes acima indicados não são tóxicos, nem aumentam a solubilidade da substância em água.

Os dispersantes podem ser úteis para o doseamento e dispersão correctos da substância. Na concentração recomendada para o meio de ensaio final (< 0,1 ml/l), os dispersantes acima indicados não são tóxicos, nem aumentam a solubilidade da substância em água.

▼B

1.7. PLANEAMENTO DO ENSAIO

Os tratamentos devem ser distribuídos pelos recipientes de ensaio e todos os processos de manuseamento subsequentes devem ser efectuados de modo aleatório. O não cumprimento destas recomendações pode provocar desvios nos resultados que poderão ser erradamente interpretados como um efeito da concentração. Em particular, se as unidades experimentais forem manuseadas por ordem de tratamento ou concentração, alguns efeitos relacionados com o tempo, como a fadiga do operador ou outro tipo de erro, poderão ter efeitos e repercussões de maior dimensão nas concentrações mais elevadas. Além disso, se houver indicações de que os resultados do ensaio podem ser afectados por uma condição inicial ou ambiental do ensaio, como a localização no laboratório, deve considerar-se a possibilidade de efectuar o ensaio por agrupamento de recipientes.

1.8. PROCEDIMENTO

1.8.1. **Condições de exposição**

1.8.1.1. *Duração*

A duração do ensaio é de 21 dias.

1.8.1.2. *Carga*

Os animais progenitores são mantidos individualmente, um em cada recipiente de ensaio, contendo cada recipiente 50-100 ml de meio.

Por vezes, podem ser necessários volumes maiores de modo a possibilitar o cumprimento dos requisitos do procedimento analítico utilizado para a determinação da concentração da substância de ensaio, embora seja também permitida a junção de repetições para análise química. Se forem utilizados volumes superiores a 100 ml, poderá ser necessário aumentar a ração fornecida às *Daphnia* de modo a assegurar uma disponibilidade adequada de alimento e o cumprimento dos critérios de validade. Em ensaios por escoamento, podem ser considerados, por razões técnicas, planos alternativos (por exemplo, quatro grupos de 10 animais num volume de ensaio maior), devendo, no entanto, qualquer alteração do plano do ensaio ser indicada no relatório.

1.8.1.3. *Número de animais*

Para ensaios semi-estáticos, deverão ser mantidos individualmente, pelo menos, 10 animais em cada concentração de ensaio e 10 animais nas séries de controlo.

Para ensaios por escoamento, concluiu-se ser adequado dividir 40 animais por quatro grupos de 10 animais para cada concentração de ensaio (1). Pode ser utilizado um número menor de organismos de ensaio, sendo recomendado um mínimo de 20 animais para cada concentração, repartidos por duas ou mais repetições com igual número de animais (por exemplo, quatro repetições com cinco animais cada). Convém salientar que nos ensaios em que os animais são mantidos em grupos, não será possível expressar a produção de descendência em termos de número total de descendentes vivos produzidos por animal progenitor vivo no fim do ensaio se os animais progenitores morrerem. Nestes casos, a produção de descendência deve ser expressa em termos de «número total de descendentes vivos produzidos por progenitor presente no início do ensaio».

1.8.1.4. *Alimentação*

Para ensaios semi-estáticos, a alimentação deve ser fornecida de preferência diariamente, no mínimo, três vezes por semana (isto é, correspondendo às mudanças de meio). Qualquer desvio em relação a essa norma (por exemplo, para ensaios por escoamento) deverá ser indicado no relatório.

▼B

Durante o ensaio, a dieta dos animais progenitores deverá consistir, de preferência, em células de algas vivas de uma ou mais das seguintes espécies: *Chlorella* sp, *Selenastrum capricornutum* [agora *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)] e *Scenedesmus subspicatus*. A dieta fornecida deve basear-se na quantidade do carbono orgânico (C) fornecida a cada animal progenitor. Os dados da investigação já realizada nesta área (12) demonstraram que, para a *Daphnia magna,* níveis de ração entre 0,1 e 0,2 mg C/*Daphnia*/dia são suficientes para atingir o número de descendentes necessário para satisfazer o critério de validade do ensaio. A ração pode ser fornecida a uma taxa constante ao longo de todo o período do ensaio ou, se for desejável, pode ser utilizada uma taxa inferior no início, que será depois aumentada durante o ensaio de modo a compensar o crescimento dos animais progenitores. Neste caso, a ração deverá continuar a manter-se dentro da gama recomendada de 0,1-0,2 mg C/*Daphma*/dia.

Se forem utilizados medições alternativas, tais como o número de células de algas ou a absorvância, para determinar o nível de ração necessário (por razões de conveniência, uma vez que as medições do teor de carbono são muito mais demoradas), cada laboratório deve produzir o seu próprio nomograma em que relacione a medida alternativa com o conteúdo em carbono da cultura de algas (ver apêndice 2 para conselhos sobre a elaboração do nomograma). Os nomogramas devem ser verificados pelo menos anualmente, e com maior frequência se tiverem sido alteradas as condições de cultura das algas. Verificou-se que a absorvância é uma medida alternativa mais adequada para a determinação do teor de carbono do que o número de células (13).

De modo a reduzir o volume do meio de cultura de algas transferido para os recipientes de ensaio, a suspensão de algas fornecida às *Daphnia* deve ser concentrada. A concentração das algas pode ser efectuada por centrifugação seguida de re-suspensão em água destilada, água desionizada ou meio de cultura de *Daphnia.*

1.8.1.5. *Luz*

Período de exposição à luz de 16 horas com uma intensidade que não exceda 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

1.8.1.6. *Temperatura*

A temperatura do meio de ensaio deve situar-se entre 18 e 22 ºC. No entanto, para qualquer ensaio, a temperatura não deve, se possível, variar mais do que 2 ºC dentro destes limites (por exemplo, 18-20, 19-21 ou 20-22 ºC). Poderá ser vantajoso utilizar um recipiente de ensaio adicional para a monitorização da temperatura.

1.8.1.7. *Arejamento*

Os recipientes de ensaio não devem ser arejados durante o ensaio.

1.8.2. **Concentrações de ensaio**

Normalmente deverão ser testadas pelo menos cinco concentrações de ensaio, dispostas numa série geométrica com um factor de separação que não exceda de preferência 3.2 e deverá ser utilizado um número de repetições apropriado para cada concentração de ensaio (ver ponto 1.8.1.3). Se forem utilizadas menos de cinco concentrações, deverá ser apresentada uma justificação. As substâncias não devem ser ensaiadas acima do seu limite de solubilidade no meio de ensaio.

▼B

Na escolha da gama de concentrações, importa ter presente o seguinte:

i) Se o objectivo consistir em determinar a LOEC/NOEC, o valor da menor concentração de ensaio deve ser suficientemente baixo de modo a que a fecundidade àquela concentração não seja significativamente inferior à do controlo. Se não for este o caso, o ensaio terá de ser repetido reduzindo a da menor concentração ensaiada;

ii) Se o objectivo for a determinação da LOEC/NOEC, o valor da maior concentração de ensaio deve ser suficientemente elevado para que a fecundidade àquela concentração seja significativamente inferior à do controlo. Se não for este o caso, o ensaio terá de ser repetido com um aumento da maior concentração;

iii) Se for estimada a CE_X para os efeitos sobre a reprodução, é aconselhável utilizar concentrações suficientes de modo a definir a CE_X com um nível de confiança apropriado. Se for estimada a CE_{50} para os efeitos sobre a reprodução, é aconselhável que a maior concentração de ensaio seja superior a este valor CE_{50}. De outro modo, embora seja ainda possível estimar o valor CE_{50}, o intervalo de confiança para o valor CE_{50} será muito alargado e poderá não ser possível estabelecer satisfatoriamente o nível de adequação do modelo ajustado;

iv) A gama de concentrações de ensaio não deverá incluir, de preferência, quaisquer concentrações que tenham um efeito estatisticamente significativo na sobrevivência de adultos, pois tal alteraria a natureza do ensaio, transformando um ensaio de reprodução simples num ensaio combinado de reprodução e mortalidade, o que exigiria urna análise estatística muito mais complexa.

O conhecimento prévio da toxicidade da substância de ensaio (obtido a partir de um ensaio de toxicidade aguda e/ou de estudos preliminares para determinação das concentrações, por exemplo) deverá ajudar na selecção das concentrações de ensaio apropriadas.

Quando for utilizado um solvente ou dispersante na preparação de soluções de ensaio (ver ponto 1.6.4), a sua concentração final nos recipientes de ensaio não deverá ser superior a 0,1 ml/l e deverá ser a mesma em todos os recipientes de ensaio.

1.8.3. **Controlos**

A par das séries de ensaio, deve ser realizada uma série de ensaios de controlo do meio c, se aplicável, uma série de controlo contendo o solvente ou o dispersante. Quando forem utilizados solventes ou dispersantes, a sua concentração deve ser igual à utilizada nos recipientes contendo a substância de ensaio. Deve utilizar-se um número apropriado de repetições (ver ponto 1.8.1.3).

Em geral, num ensaio bem realizado, o coeficiente de variação relativamente ao número médio de descendentes vivos produzidos por animal progenitor no(s) controlo(s) deve ser < 25 %, o que deverá ser descrito nos planos de ensaio que utilizem animais mantidos individualmente.

1.8.4. **Renovação do meio de ensaio**

A frequência da renovação do meio dependerá da estabilidade da substância de ensaio, mas deve ser no mínimo de três vezes por semana. Se, a partir de ensaios de estabilidade preliminares (ver ponto 1.4) a concentração da substância de ensaio não for estável (isto é, se ela se situar fora da gama de 80-120 % do valor nominal ou abaixo de 80 % da concentração inicial medida) durante o período máximo de renovação (isto é, três dias), deve considerar-se uma renovação mais frequente do meio ou efectuar um ensaio por escoamento.

▼B

Nos ensaios semi-estáticos, quando o meio é renovado, deverá preparar-se uma segunda série de recipientes de ensaio e para onde se transferem os animais progenitores utilizando, por exemplo, uma pipeta de vidro de diâmetro adequado. O volume do meio transferido com a *Daphnia* deve ser reduzido ao mínimo.

1.8.5. **Observações**

Os resultados das observações realizadas durante o ensaio devem ser registados em folhas de dados (ver exemplos nos apêndices 3 e 4). Se tiverem de ser efectuadas outras medições, poderá ser necessário efectuar observações adicionais (ver pontos 1.3 e 1.8.8).

1.8.6. **Descendência**

Os descendentes produzidos por cada animal progenitor devem ser retirados e contados, de preferência diariamente desde o aparecimento dos primeiros juvenis, para evitar que estes consumam a comida destinada aos adultos. Embora para atingir o objectivo deste método apenas seja necessário contar o número de descendentes vivos, a presença de ovos abortados ou descendentes mortos também deverá ser indicada no relatório.

1.8.7. **Mortalidade**

A mortalidade entre os animais progenitores deve ser registada, de preferência diariamente ou, no mínimo, quando se efectua a contagem dos descendentes.

1.8.8. **Outros parâmetros**

Embora este método seja planeado sobretudo para avaliar os efeitos sobre a reprodução, é possível que outros efeitos possam também ser suficientemente quantificados de modo a permitir urna análise estatística. As medições relativas ao crescimento são desejáveis, pois fornecem informação sobre possíveis efeitos subletais, que podem ser mais úteis que a simples medição relativa à reprodução. Recomenda-se a medição do comprimento dos animais progenitores (isto é, o comprimento do corpo excluindo o espinho anal) no fim do ensaio. O tempo necessário para a produção da primeira ninhada (e seguintes), o número e tamanho das ninhadas por animal progenitor, o número de ovos abortados, a presença de machos ou ovos de repouso (*ephippia*) e a taxa intrínseca de crescimento da população são outros parâmetros que podem ser medidos ou calculados.

1.8.9. **Frequência das determinações analíticas e medições**

Pelo menos uma vez por semana, deve ser medida a concentração de oxigénio, a temperatura, o grau de dureza e os valores de pH nos meios frescos e velhos, nos controlo(s) e na maior concentração da substância de ensaio.

As concentrações da substância de ensaio são determinadas a intervalos regulares durante o ensaio.

Nos ensaios semi-estáticos, em que a concentração da substância de ensaio deverá manter-se entre ± 20 % do valor nominal (isto é, dentro da gama dos 80-120 % — ver 1.4 e 1.8.4), recomenda-se que, no mínimo, sejam analisadas a maior e menor concentrações de ensaio quando acabadas de preparar e uma vez durante a primeira semana do ensaio, na altura da renovação do meio (isto é, devem efectuar-se análises numa amostra da solução no momento em que esta acaba de ser preparada e no momento da renovação do meio). A partir de então, estas determinações devem ser repetidas, pelo menos, a intervalos semanais.

▼B

Para os ensaios em que não é esperado que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro de ± 20 % do valor nominal, é necessário analisar todas as concentrações de ensaio no momento em que as soluções acabam de ser preparadas e na altura da renovação do meio. No entanto, para os ensaios em que a concentração inicial medida da substância de ensaio não se encontra no intervalo de ± 20 % do valor nominal, mas em que é possível fornecer provas suficientes de que as concentrações iniciais são reprodutíveis e estáveis (isto é, mantêm-se dentro da gama dos 80 — 120 % das concentrações iniciais), as determinações químicas para concentrações de ensaio poderão ser reduzidas na segunda e terceira semana do ensaio, limitando-se à maior e menor concentração. Em todos os casos, a determinação das concentrações da substância de ensaio antes da renovação do meio só precisa de ser efectuada no recipiente de uma das repetições, para cada concentração de ensaio.

Se for efectuado um ensaio por escoamento, é adequado aplicar um método de amostragem semelhante ao descrito para os ensaios semi-estáticos (não sendo, neste caso, aplicável a medição de soluções «usadas»). No entanto pode ser aconselhável aumentar o número de amostragens durante a primeira semana (efectuando três conjuntos de medições, por exemplo) de modo a assegurar que as concentrações de ensaio se mantêm estáveis. Nestes tipos de ensaio, a taxa de fluxo do diluente e da substância de ensaio deverá ser verificada diariamente.

Se existirem provas de que, durante o ensaio, a concentração da substância de ensaio não excedeu ± 20 % do valor da concentração nominal ou da concentração inicial medida, os resultados podem basear-se nos valores nominais ou iniciais medidos. Se o desvio em relação ao valor nominal ou da concentração inicial medida for superior a ± 20 %, os resultados devem ser expressos através da média ponderada em função do tempo (ver o apêndice 5).

2. DADOS E RELATÓRIO

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

O objectivo deste ensaio consiste em determinar o efeito da substância de ensaio no número total de descendentes vivos produzidos por animal progenitor vivo no fim do ensaio. Deverá calcular-se o número total de descendentes por animal progenitor em cada recipiente de ensaio (isto é, em cada repetição). Se, em qualquer repetição, se observar a presença de animais progenitores mortos durante o ensaio ou se o progenitor for um macho, a repetição é excluída do ensaio. A análise basear-se-á então num número reduzido de repetições.

Para determinar a LOEC e, consequentemente, a NOEC em relação aos efeitos da substância química na produção de descendência, é necessário calcular a produção da descendência média nas repetições de cada concentração e o desvio-padrão residual conjunto, o que poderá ser feito através de uma análise de variância (ANOVA). A média para cada concentração deve ser então comparada com a média observada no controlo, utilizando um método de comparações múltiplas apropriado. Os testes de Dunnett ou Williams (14) (15) (16) (17) poderão ser úteis para o efeito. É necessário verificar se se verifica a presunção de homogeneidade da variância calculada através da ANOVA. Recomenda-se que isso seja realizado graficamente e não por meio de um teste de significância formal (18); uma alternativa adequada consiste em realizar um teste de Bartlett. Se esta presunção não se verificar, deve considerar-se a transformação dos dados de modo a homogeneizar as variâncias antes de realizar a ANOVA, ou a realização de uma ANOVA ponderada. Deve ser calculada e registada a dimensão do efeito detectável através da ANOVA (isto é, a diferença menos significativa).

▼B

Para efectuar uma estimativa da concentração que causaria uma redução de 50 % no resultado reprodutivo (isto é, a CE_{50}), deverá ajustar-se aos dados uma curva adequada (curva logística, por exemplo), utilizando um método estatístico como, por exemplo, o método dos mínimos quadrados. A curva pode ser parametrizada de modo a que a CE_{50} e o seu desvio-padrão possam ser estimados directamente, o que facilitaria enormemente o cálculo dos limites de confiança da CE_{50}. Deverão ser utilizados limites de confiança de mais ou menos 95 %, a não ser que existam boas razões para preferir níveis de confiança diferentes. É aconselhável que o procedimento de ajuste da curva permita avaliar a significância dos desvios. Isto poderá ser realizado graficamente ou dividindo a soma residual dos quadrados em «desvios de ajuste» e «componentes de erro puro» e realizando um teste de significância para os desvios. Uma vez que os tratamentos que resultam em elevada fecundidade são susceptíveis de registar, relativamente ao número de juvenis produzidos, uma variação superior à que se verifica nos tratamentos que resultam em baixa fecundidade, deverá considerar-se a ponderação dos valores observados de modo a reflectir as diferentes variâncias nos diferentes grupos de tratamento [para informação sobre este assunto, ver referência (18)].

Na análise dos dados do ensaio interlaboratorial final (2), a curva logística foi ajustada utilizando o modelo seguinte, embora possam ser adoptados outros modelos adequados:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

em que:

Y = é o número total de juvenis por animal progenitor vivo no fim do ensaio (calculado para cada recipiente)

x = é o valor da concentração da substância

c = é o número esperado de juvenis quando x = 0

x_0 = é o valor CE_{5o} na população

b = é o parâmetro de declive

Este modelo deverá ser adequado num elevado número de situações, embora possivelmente não o seja para todos os ensaios. Como se propõe acima, deve realizar-se um teste para verificar a validade do modelo. Em alguns casos, poderá ser apropriado utilizar um modelo hormesis, no qual os efeitos observados a baixas concentrações são ampliados (19).

Poderão também ser estimadas outras concentrações, tais como a CE_{10} ou CE_{20}, embora neste caso possa ser preferível utilizar uma parametrização do modelo diferente da utilizada para estimar a CE_{50}.

2.2. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir o seguinte:

2.2.1. **Substância de ensaio:**

— natureza física e propriedades físico-químicas relevantes,

▼B

— dados relativos à identificação química, incluindo a pureza.

2.2.2. **Espécie de ensaio:**

— o clone (quer tenha sido ou não geneticamente identificado), o fornecedor ou fonte (se conhecidos) e as condições de cultura utilizadas. Se for utilizada uma espécie diferente de *Daphnia magna,* tal deverá ser registado e justificado.

2.2.3. **Condições do ensaio:**

— o método de ensaio utilizado (por exemplo, semi-estático ou por escoamento, o volume, a carga expressa em número de *Daphnia* por litro),

— fotoperíodo e intensidade da luz,

— plano do ensaio (número de repetições, número de progenitores por repetição, por exemplo),

— informações pormenorizadas sobre o meio de cultura utilizado,

— eventuais adições de material orgânico, incluindo a composição, a fonte, o método de preparação, o COT/CQO de preparações de reserva, a estimativa do COT/CQO resultante no meio de ensaio,

— informação pormenorizada sobre a alimentação, incluindo as quantidades (em mg C/*Daphnia*/dia) e a descrição [o tipo de alimento(s), incluindo — para as algas — o nome específico (espécie) e, se conhecida, a estirpe e as condições de cultura, por exemplo],

— método de preparação das soluções de reserva e frequência de renovação do meio (quando utilizados, devem ser fornecidas as concentrações do solvente ou dispersante).

2.2.4. **Resultados:**

— resultados de quaisquer estudos preliminares sobre a estabilidade da substância de ensaio,

— o valor nominal das concentrações de ensaio e os resultados de todas as análises para determinar a concentração da substância de ensaio nos recipientes de ensaio (ver exemplo de folha de dados no apêndice 4); a eficiência de recuperação do método e o limite de determinação também deverão ser regista dos,

— a qualidade da água nos recipientes de ensaio (isto é, o pH, a temperatura e a concentração de oxigénio dissolvido, assim como o COT e/ou a CQO e a dureza, quando aplicável) (ver exemplo de folha de dados no apêndice 3),

— o registo completo da descendência viva de cada animal progenitor (ver exemplo nas folhas de dados do apêndice 3),

— o número de animais progenitores mortos e o dia em que ocorreu a morte (ver exemplo de folha de dados no apêndice 3).

— o coeficiente de variação da fecundidade no controlo (baseado no número total de descendentes vivos por animal progenitor vivo no fim do ensaio),

— representação gráfica do número total de descendentes vivos por animal progenitor vivo (para cada repetição) no fim do ensaio, em função da concentração da substância de ensaio,

— a menor concentração com efeito observável (LOEC) na reprodução, incluindo uma descrição dos métodos estatísticos utilizados, uma indicação da dimensão do efeito que poderia ser detectada e a concentração sem efeito observável (NOEC) na reprodução; quando for apropriado, também deverão ser regista dos os valores LOEC/NOEC para a mortalidade dos animais progenitores,

▼B

— quando for apropriado, o valor CE_X para a reprodução, os intervalos de confiança, um gráfico do modelo ajustado utilizado para o seu cálculo, o declive da curva de dose/resposta e o seu desvio-padrão,

— outras medições ou efeitos biológicos observados: descrição de qualquer outro efeito biológico que tenha sido observado ou medido (crescimento de animais progenitores, por exemplo), incluindo qualquer justificação apropriada,

— uma explicação para qualquer desvio do método de ensaio.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.

(2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the Daphnia *magna* Reproduction Test Paris. 1997.

(3) Baird D. J., Barber J., Bradley M. C, Soares A. M. V. M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, p. 257-265.

(4) Elendt B. P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, p. 25-33.

(5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

(6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, p. 775-782.

(7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 p.

(8) Baird D. J., Soares A. M. V. M., Girling A., Barber J., Bradley M. C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.), p. 144-148.

(9) Parkhurst B. R., Forte J. L. and Wright G. P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, p. 1-8.

(10) Cowgill U. M. and Milazzo D. P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), p. 185-196.

(11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

(12) Sims I. R., Watson S. and Holmes D. (199 3). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, p. 2053-2058.

▼B

(13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, p. 459-466.

(14) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, p. 1096-1121.

(15) Dunnett C. W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, p. 482-491.

(16) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, p. 103-117.

(17) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, p. 510-531.

(18) Draper N. R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, p. 93-96.

(20) Wilson E. O. and Bossert, W. H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

(21) Poole R. W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. McGraw-Hill Series in Population Biology, New York, p. 532.

(22) Meyer J. S., Ingersoll C. G., McDonald L. L. and Boyce M. S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, p. 1156-1166.

▼B

Apêndice I

PREPARAÇÃO DOS MEIOS TOTALMENTE DEFINIDOS ELENDT M7 E M4

Aclimatação aos meios Elendt M7 e M4

Alguns laboratórios tiveram dificuldades na transferência directa de *Daphnia* para os meios M4 (1) e M7. No entanto, obteve-se algum sucesso com uma aclimatação gradual, isto é, transferindo do próprio meio para Elendt a 30 %, a 60 % e, por fim, a 100 %. Os períodos de aclimatação necessários podem atingir a duração de um mês.

PREPARAÇÃO

Elementos vestigiais

Em primeiro lugar, preparam-se soluções de reserva separadas (I) de elementos vestigiais individuais em água com um grau de pureza adequado — por exemplo, desionizada, destilada ou submetida a osmose inversa. A partir destas soluções de reserva individuais (I), é preparada uma segunda solução de reserva simples (II), que contém todos os elementos vestigiais (solução combinada), isto é:

Soluções de reserva I (substância simples)	Quantidade adicionada à água (mg/l)	Concentração (em relação ao meio M4) x (vezes)	Para preparar a solução de reserva combinada II, adicionar a seguinte quantidade de solução de reserva I à água (ml/l)	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2$ * 4 H_2O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2$ * 6 H_2O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na_2MoO_4 * 2 H_2O	1 260	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2$ * 2 H_2O	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2$ * 6 H_2O	200	20 000	1,0	1,0
Kl	65	20 000	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2 H_2O$	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4$ * 7 H_2O	1 991	2 000	—	—
Ambas as soluções Na_2EDTA e $FeSO_4$ são preparadas individualmente, juntas e imediatamente autoclavadas. Isto dá:				
21 solução Fe-EDTA		1 000	20,0	5,0

▼B

Meios M4 e M7

Os meios M4 e M7 são preparados utilizando a solução de reserva II, os macronutrientes e as vitaminas tal como indicado:

	Quantidade adicionada à água (mg/l)	Concentração (relacio-nada com o meio M4) X (vezes)	Quantidade de solução de reserva adicionada para preparar o meio ml/l	
			M 4	M 7
Solução de reserva 11 elementos vestigiais combinados		20	50	50
Soluções de reserva de macronutrientes (substância única)				
$CaCl_2$ * 2 H_2O	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4$ * 7 H_2O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
Na_2SiO_3 * 9 H_2O	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1
Solução de reserva de vitaminas	—	10 000	0,1	0,1
A solução de reserva de vitaminas é preparada adicionando as três vitaminas a 1 l de água como se mostra em baixo:				
Hidrocloreto de tiamina	750	10 000	—	—
Cianocobalamina (B_{12})	10	10 000	—	—
Biotina	7,5	10 000	—	—

A solução de reserva de vitaminas é armazenada e congelada em pequenas alíquotas. As vitaminas são adicionadas ao meio imediatamente antes da utilização.

Notas: Para evitar a precipitação dos sais quando se prepara o meio completo, adicionar as alíquotas de soluções de reserva a cerca de 500-800 ml de água desionizada e perfazer até 1 l.

A primeira publicação relativa ao meio M4 tem a seguinte referência: Elendt, B.P. (1990). *Selenium deficiency in crustacea: an ultras-tructural approach* to *antennal damage* in Daphnia magna *Straus*. Protoplasma, 154, 25-33.

▼B

Apêndice 2

ANÁLISE DO CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT) E PRODUÇÃO DE UM NOMOGRAMA PARA O TEOR COT DAS ALGAS QUE SERVEM DE ALIMENTO

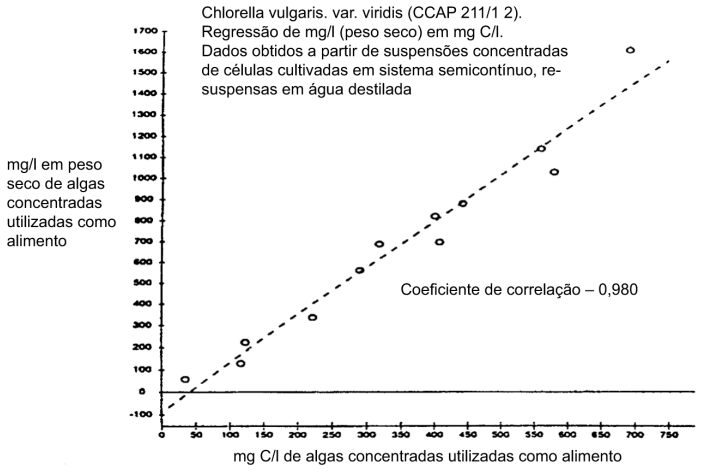
Reconhece-se que o teor de carbono das algas que servem de alimento não será normalmente medido directamente, mas sim através de correlações (isto é, nomogramas) com medições alternativas, tais como o número de células de algas ou a absorvância).

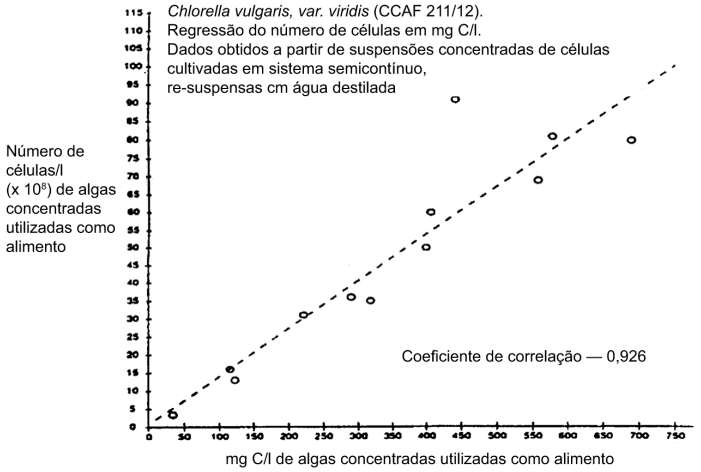
O COT deve ser medido por oxidação a alta temperatura em vez de utilizar métodos de UV ou persulfato. (ver: *The Instrumental Determination of Total* Organic *Carbon. Total Oxygen Demand and Related Determinands* 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Para a elaboração do nomograma, as algas devem ser separadas do meio de crescimento por centrifugação, seguida de re-suspensão em água destilada. Medir o parâmetro de substituição e a concentração de COT em cada amostra em triplicado. Devem ser analisados «brancos» de água destilada e a concentração de COT deverá ser deduzida a partir da concentração de COT presente na amostra de algas.

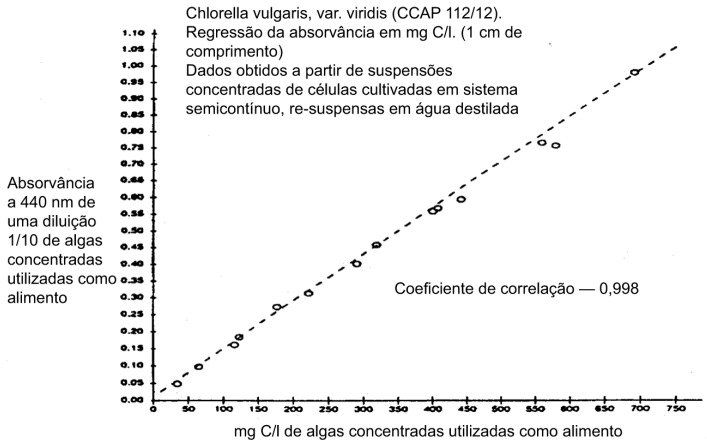
O nomograma deve ser linear em toda a gama de concentrações de carbono necessária. São indicados a seguir alguns exemplos.

Nota: Estes exemplos não deverão ser aproveitados para efectuar conversões; é essencial que os laboratórios preparem os seus próprios nomogramas.





▼B


Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 112/12).
Regressão da absorvância em mg C/l. (1 cm de comprimento)
Dados obtidos a partir de suspensões concentradas de células cultivadas em sistema semicontínuo, re-suspensas em água destilada
Absorvância a 440 nm de uma diluição 1/10 de algas concentradas utilizadas como alimento
Coeficiente de correlação — 0,998
mg C/l de algas concentradas utilizadas como alimento

▼B

Apêndice 3

EXEMPLO DE FOLHAS DE DADOS COM REGISTO DA RENOVAÇÃO DOS MEIOS, DADOS DE MONITORIZAÇÃO FÍSICA/QUÍMICA, ALIMENTAÇÃO, REPRODUÇÃO DE *DAPHNIA* E MORTALIDADE DE ADULTOS

Experiência número:	Dados iniciais:				Clone:				Meio:				Tipo de alimento			Substância de ensaio:							Conc. nominal:	
Dia	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Renovação do meio (assinalar os dias)																								
PH ([1])																							novo	
																							velho	
O_2 mg/l ([1])																							novo	
																							velho	
Temperatura (ºC) ([1])																							novo	
																							velho	
Alimentos fornecidos (assinalar os dias)																								
Número de descendentes vivos																								Total
Recipiente 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

▼B

Experiência número:	Dados iniciais:	Clone:	Meio:	Tipo de alimento	Substância de ensaio:	Conc. nominal:

Dia	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Total	
Mortalidade cumulativa de adultos																								

([1]) Indicar o recipiente utilizado na experiência.

▼B

Apêndice 4

EXEMPLO DE FOLHA DE DADOS PARA REGISTO DE RESULTADOS DA ANÁLISE QUÍMICA

a) **Concentrações medidas**

Conc. nominal	Amostra da semana 1		Amostra da semana 2		Amostra da semana 3	
	Nova	Velha	Nova	Velha	Nova	Velha

b) **Concentrações medidas em percentagem do valor nominal**

Conc. nominal	Amostra da semana 1		Amostra da semana 2		Amostra da semana 3	
	Nova	Velha	Nova	Velha	Nova	Velha

▼B

Apêndice 5

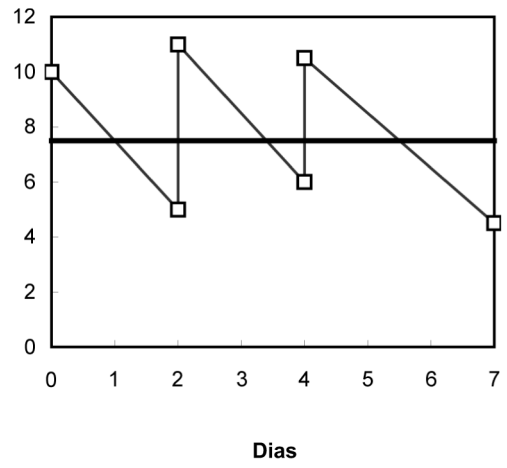
CÁLCULO DA MÉDIA PONDERADA EM FUNÇÃO DO TEMPO

Média ponderada em função do tempo

Considerando que a concentração da substância de ensaio pode diminuir durante o período entre renovações do meio, é necessário determinar um valor de concentração representativo da gama de concentrações a que os progenitores *Daphnia* foram expostos. A determinação desse valor deve basear-se tanto em considerações biológicas como estatísticas. Por exemplo, se se considerar que a reprodução é afectada principalmente pela concentração máxima experimentada, deverá utilizar-se a concentração máxima, No entanto, se se considerar que o efeito acumulado ou a longo prazo da substância tóxica tem um peso mais importante, será mais adequado utilizar um valor médio de concentração. Neste caso, a concentração média ponderada em função do tempo será um valor apropriado, uma vez que considera a variação da concentração instantânea ao longo do tempo.

Figura 1:

Exemplo de média ponderada em função do tempo



A figura 1 mostra um exemplo de um ensaio (simplificado) com a duração de sete dias, em que o meio é renovado nos dias 0, 2 e 4.

— A linha em ziguezague representa a concentração ao longo do tempo. Assume-se que a queda do valor de concentração segue uma curva exponencial.

— Os seis pontos representados no gráfico representam as concentrações medidas no início e fim de cada período de renovação.

— A linha mais espessa indica a posição da média ponderada em função do tempo.

A média ponderada em função do tempo é calculada de modo a que a área abaixo desse valor seja igual à área abaixo da curva de concentração. O quadro 1 apresenta em pormenor o cálculo correspondente ao exemplo da figura 1.

▼B

Quadro 1:

Cálculo da média ponderada em função do tempo

Número da renovação	Dias	Conc0	Conc 1	Ln(Conc0)	Ln(Concl)	Área
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Total de dias: 7					Área total	50,091
					Média ponderada em função do tempo	7,156

A coluna «Dias» corresponde ao número de dias no período de renovação.

A coluna «Conc0» corresponde à concentração medida no início de cada período de renovação.

A coluna «Conc1» corresponde ã concentração medida no fim de cada período de renovação.

A coluna «Ln(Conc0)» corresponde ao logaritmo natural de Conc0.

A coluna «Ln(Conc1)» corresponde ao logaritmo natural de Concl.

A coluna «Área» corresponde à área abaixo da curva exponencial para cada período de renovação. É calculada através da seguinte fórmula:

$$Área = \frac{Conc0 - Conc1}{\mathrm{Ln}(Conc0) - \mathrm{Ln}(Conc1)} \times Dias$$

A média ponderada em função do tempo (MPFT) é a «Área total» dividida pelo «Total de dias».

Para o ensaio de reprodução de *Daphnia,* o quadro deverá, obviamente, ser aumentado de modo a abranger 21 dias.

É óbvio que, quando as observações se limitam ao princípio e ao fim de cada período de renovação, não é possível confirmar se o decaimento segue, de facto, uma curva exponencial. Uma curva diferente resultará num cálculo diferente para os valores da «Área». No entanto, o decaimento seguindo uma curva exponencial constitui um modelo plausível, que não é de excluir e que, na ausência de outras informações, constituirá, provavelmente, a curva mais adequada.

No entanto, é necessário tomar algum cuidado no caso de a análise química não permitir detectar a substância no fim do período de renovação. A não ser que seja possível estimar a velocidade a que a substância desapareceu da solução, é impossível obter uma área realista abaixo da curva e, consequentemente, é impossível obter uma média ponderada em função do tempo que seja razoável.

▼B

C.21. MICROoRGANISMOS DO SOLO: ENSAIO DE TRANSFORMAÇÃO DE AZOTO

1. MÉTODO

O presente método de ensaio baseia-se na publicação OCDE TG 216 (1999).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio descreve um método laboratorial concebido para a investigação dos efeitos, a longo prazo, resultantes de uma única exposição a produtos químicos, na capacidade de transformação do azoto pelos microorganismos do solo. O ensaio baseia-se, fundamentalmente, nas recomendações da Organização Europeia e Mediterrânica para a Protecção das Plantas (1), embora tenham sido igualmente consideradas outras linhas de orientação, nomeadamente as fornecidas pelas seguintes organizações: Biologische Bundesanstalt da Alemanha (2); Agência de Protecção do Ambiente dos EUA (3); SETAC (4) e Organização Internacional de Normalização (ISO) (5). As orientações respeitantes ao número e tipo de solos a utilizar neste ensaio são as acordadas na reunião de trabalho da OCDE sobre Selecção de Solos/Sedimentos que decorreu em Belgirate, Itália, em 1995 (6). As recomendações respeitantes à recolha, manuseamento e armazenamento de amostras de solos baseiam-se nas normas ISO 10381-6 (7) e nas recomendações da reunião de Belgirate. A determinação e avaliação das características de toxicidade de determinadas substâncias de ensaio poderão requerer a determinação dos seus efeitos sobre a actividade microbiana dos solos, por exemplo, quando se pretendem conhecer os potenciais efeitos secundários de produtos utilizados na protecção de culturas agrícolas sobre a microflora do solo ou quando se prevê a exposição dos microorganismos do solo a outro tipo de substâncias químicas. O ensaio de transformação de azoto aplica-se na determinação dos efeitos destes produtos sobre a microflora do solo. No ensaio de produtos químicos agrícolas (por exemplo, produtos de protecção de culturas, fertilizantes, químicos florestais) deverão realizar-se os ensaios de transformação de azoto e de transformação de carbono. Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas, considera-se suficiente a realização do ensaio de transformação de azoto, ressalvando-se os casos em que os valores de CE_{50} obtidos no ensaio de transformação de azoto se encontrem dentro dos valores correspondentes aos inibidores de nitrificação comerciais (por exemplo, nitrapirina), casos em que deve ser efectuado um ensaio de transformação de carbono no sentido de se obter informação adicional.

Os solos são misturas complexas e heterogéneas de elementos vivos e não vivos. Os microorganismos desempenham um papel importante na decomposição e transformação da matéria orgânica em solos férteis através de processos complexos em que diversas espécies contribuem de forma distinta para cada um dos factores que determinam a fertilidade do solo. Por este motivo, qualquer interferência a longo prazo nos processos bioquímicos envolvidos constitui uma potencial interferência nos ciclos nutricionais, podendo vir a afectar a fertilidade do solo. A transformação de carbono e de azoto ocorre em todos os solos férteis e, ainda que as comunidades de microorganismos responsáveis por estes processos divirjam de solo para solo, as vias e processos de transformação são essencialmente os mesmos.

O Método de Ensaio aqui descrito foi desenvolvido com o objectivo de determinar os efeitos adversos a longo prazo de uma substância no processo de transformação de azoto em solos aeróbios de superfície. Este método de ensaio permite ainda estimar os efeitos dos produtos testados sobre a transformação de carbono pela microflora dos solos. Uma vez que a formação de nitratos ocorre subsequentemente à quebra das ligações azoto-carbono, a observação de taxas idênticas de produção de nitratos em solos tratados e de referência indica que é muito elevada a probabilidade de as principais etapas de degradação do carbono se encontrarem intactas e funcionais. O substrato escolhido para o ensaio (farinha de luzerna) possui uma relação carbono/azoto adequada (geralmente entre 12/1 e 16/1). Por este motivo, a privação de carbono é reduzida durante o ensaio e, no caso de as comunidades de microorganismos serem afectadas por um produto químico, será possível a sua recuperação num período de 100 dias.

▼B

Os ensaios que serviram de base ao presente Método de Ensaio foram inicialmente desenvolvidos para substâncias relativamente às quais é possível estimar a quantidade de substância que atinge o solo. É o caso, por exemplo, dos produtos utilizados para a protecção de culturas agrícolas, uma vez que é conhecida a sua taxa de aplicação nos campos. No caso de produtos químicos agrícolas, considera-se suficiente o ensaio de duas doses relevantes, relativamente à taxa de aplicação estimada ou prevista. Os produtos químicos agrícolas podem ser testados como ingredientes activos (i.a.) ou como formulações. A aplicação deste ensaio não se limita, no entanto, a produtos químicos agrícolas. Fazendo variar simultaneamente a quantidade de substância de ensaio aplicada no solo e o método de avaliação dos dados, o ensaio poderá ser igualmente utilizado em situações em que não é conhecida a quantidade de produto químico que atinge o solo Deste modo, para produtos químicos não agrícolas, deverão determinar-se os efeitos de uma série de concentrações sobre a transformação de azoto e utilizar-se os dados obtidos nesses ensaios para construir uma curva de dose-resposta, a partir da qual se calculam os valores de CE_x, em que x corresponde à percentagem de efeito.

1.2. DEFINIÇÕES

Transformação de azoto: é a degradação total por microorganismos de matéria orgânica contendo azoto, através do processo de amonificação e nitrificação, até ao respectivo nitrato inorgânico final.

EC_x (Concentração Efectiva): é a concentração da substância de ensaio no solo que resulta numa percentagem x de inibição da transformação de azoto em nitrato.

EC_{50} (Concentração Média Efectiva): é a concentração da substância de ensaio no solo que resulta em 50 % de inibição da transformação de azoto em nitrato.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Depois de peneirado, adiciona-se ao solo uma farinha de cereal, após o que se reserva uma parte que irá ser utilizada como controlo e se trata o restante com a substância de ensaio. No ensaio de produtos químicos agrícolas recomenda-se o teste de um mínimo de duas concentrações, que deverão ser escolhidas tendo em conta a maior concentração de substância que se prevê que venha a ser aplicada no campo. Após 0, 7, 14 e 28 dias de incubação, procede-se à extracção de amostras dos solos tratados e de controlo com um solvente adequado e determinam-se as quantidades de nitratos nos extractos. A taxa de formação de nitratos nas amostras tratadas é comparada com a taxa de formação de nitratos nas amostras de controlo e calcula-se a percentagem de desvio das amostras tratadas. Todos os ensaios têm uma duração mínima de 28 dias. Se ao 28.º dia as diferenças entre as amostras tratadas e as amostras não tratadas forem iguais ou superiores a 25 %, deverão continuar a efectuar-se medições até ao limite de 100 dias. Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas, adiciona-se uma série de concentrações da substância de ensaio a amostras de solo, medindo-se as quantidades de nitratos formadas nas amostras tratadas e nas amostras de controlo após 28 dias de incubação. Os resultados dos ensaios com múltiplas concentrações são analisados através de um modelo de regressão, com base no qual se calculam os valores de CE_X (isto é: CE_{50}, CE_{25} ou CE_{10}). Ver definições.

1.5 VALIDADE DO ENSAIO

As análises dos resultados dos ensaios com produtos químicos agrícolas baseiam-se em diferenças relativamente pequenas (isto é, com um valor médio de ± 25 %) entre as concentrações de nitrato nas amostras de solo tratadas e nas amostras de controlo. Por este motivo, e uma vez que grandes variações entre as amostras de controlo podem conduzir a resultados falsos, a variação entre repetições das amostras de controlo deve ser inferior a ± 15 %.

▼B

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Equipamento**

Os recipientes utilizados durante o ensaio devem ser de materiais quimicamente inertes e ter uma capacidade adequada ao método usado na incubação dos solos, isto é, a granel ou numa série de amostras de solo individualizadas (ver secção 1.7.1.2). Devem tomar-se precauções no sentido de minimizar as perdas de água e permitir trocas gasosas durante o ensaio (por exemplo, os recipientes de ensaio podem ser cobertos com folhas de polietileno perfuradas). Para o ensaio de substâncias voláteis, devem ser usados recipientes seláveis e estanques com dimensões que permitam que aproximadamente um quarto do seu volume seja ocupado pela amostra de solo.

Utiliza-se, para além do equipamento corrente de laboratório, o seguinte equipamento:

— mecanismo de agitação: agitador mecânico ou equipamento equivalente,

— mecanismo de centrifugação (3 000 g) ou de filtração (uso de filtro que não contenha nitratos),

— instrumento de sensibilidade e reprodutibilidade adequadas para análise de nitratos.

1.6.2. **Selecção e número de solos**

No presente ensaio utiliza-se um único solo, cujas características recomendadas são as seguintes:

— teor de areia: não inferior a 50 % e não superior a 75 %,

— pH: 5,5 a 7,5,

— teor de carbono orgânico: 0,5 a 1,5 %,

— a biomassa microbiana deve ser medida (8)(9) e o seu teor de carbono deve corresponder, no mínimo, a 1 % do total de carbono orgânico do solo.

Na maioria dos casos, um solo com estas características representa a situação menos favorável, uma vez que nestas condições a adsorção da substância química de ensaio é mínima e a sua disponibilidade para a microflora é máxima. Por este motivo, a realização de ensaios com outros solos é geralmente desnecessária. Contudo, em determinadas circunstâncias, por exemplo, quando se prevê que a substância de ensaio venha a ser principalmente utilizada em solos específicos, tais como solos florestais acídicos, ou para produtos químicos com carga electrostática, poderá ser necessário utilizar um solo adicional.

▼B

1.6.3. **Recolha e armazenamento das amostras de solo**

1.6.3.1. *Recolha*

Deve existir, e estar disponível, informação pormenorizada sobre a história do local donde foram recolhidas, as amostras de solo para o ensaio. A informação necessária inclui a localização exacta, o coberto vegetal, as datas dos tratamentos com produtos utilizados para a protecção de culturas agrícolas, os tratamentos com fertilizantes orgânicos e inorgânicos, as aplicações de materiais biológicos e as de contaminações acidentais. Deverá ser escolhido, para a recolha de solo, um local que permita o seu uso a longo prazo. Consideram-se locais adequados: as pastagens permanentes, os campos com culturas anuais de cereais (à excepção de milho) ou os campos densamente semeados para produção de adubo natural. No local escolhido para a amostragem não devem ter sido aplicados produtos de protecção de culturas agrícolas, pelo menos, durante o último ano, nem nenhum fertilizante orgânico, pelo menos, nos últimos seis meses. O uso de fertilizantes minerais apenas poderá ser aceite quando em concordância com as necessidades das culturas agrícolas e, nesse caso, a recolha de amostras de solo não deverá ser efectuada antes de passados três meses após a aplicação do fertilizante. Deve ser evitado o uso de solos tratados com fertilizantes que tenham efeitos biocidas conhecidos (por exemplo, cianamida de cálcio).

Deve ser evitada a recolha de amostras durante, ou imediatamente após, períodos longos (superiores a 30 dias) de seca ou de excessos de água. Em solos lavrados, as amostras devem ser recolhidas a uma profundidade de 0 a 20 cm. Nas pastagens ou outros solos que não são lavrados durante períodos longos (pelo menos, uma época de cultivo), a profundidade máxima de amostragem pode ser ligeiramente superior a 20 cm (por exemplo, até 25 cm).

As amostras de solo devem ser transportadas em recipientes adequados, em condições de temperatura que garantam que as propriedades iniciais do solo não são alteradas de forma significativa.

1.6.3.2. *Armazenamento*

Sempre que possível, é de preferir a utilização de amostras de solos recolhidas na altura. Nos casos em que o armazenamento em laboratório não possa ser evitado, os solos devem ser armazenados no escuro, a uma temperatura de 4 ± 2 ºC e por um período máximo de três meses. Durante o armazenamento dos solos, devem ser asseguradas condições aeróbias. Se os solos forem recolhidos em zonas onde permanecem gelados por períodos iguais ou superiores a três meses por ano, poderá ser considerada a hipótese do seu armazenamento durante seis meses a uma temperatura entre 18 ºC negativos e 22 ºC negativos. A biomassa microbiana de solos armazenados é medida antes de cada experiência e o teor de carbono na biomassa não deverá ser inferior a 1 % do teor total de carbono orgânico no solo (ver secção 1.6.2).

1.6.4. **Manuseamento e preparação do solo para o ensaio**

1.6.4.1. *Pré-incubação*

Se o solo esteve armazenado (ver secção 1.6.3.2), recomenda-se um período de pré-incubação de 2 a 28 dias. A temperatura e a humidade do solo durante a pré-incubação e o ensaio devem ser idênticas às utilizadas durante o ensaio (ver secções 1.6.4.2 e 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2. *Características físico-químicas*

Os objectos de grandes dimensões (por exemplo, pedras, pedaços de plantas, etc.) são removidos manualmente do solo e a amostra é peneirada húmida, evitando dessecação excessiva, de forma a reduzir as partículas a uma dimensão máxima de 2 mm. O teor de humidade da amostra de solo deve ser ajustado com água destilada ou desionizada para um valor entre 40 % e 60 % da sua capacidade máxima de retenção de água.

1.6.4.3. *Adição de substrato orgânico*

Deverá ser adicionado ao solo um substrato orgânico adequado — por exemplo, farinha de luzerna-erva-relva (componente principal: *Medicago sativa)* com uma relação C/N entre 12/1 e 16/1. A relação luzerna-solo recomendada é de 5 g de luzerna por quilograma de solo (peso seco).

1.6.5. **Preparação da substância de ensaio para aplicação no solo**

A aplicação da substância de ensaio no solo envolve, geralmente, a utilização de um excipiente (matriz de transporte), que pode ser água (para substâncias hidrossolúveis) ou um sólido inerte, como, por exemplo, areia fina de quartzo (tamanho de partículas: 0,1 a 0,5 mm). A utilização de outros excipientes líquidos (por exemplo, solventes orgânicos, como acetona, clorofórmio) deve ser evitada devido à possibilidade de virem a afectar a microflora. Nos casos em que se use areia como excipiente, esta pode ser coberta com a substância de ensaio em solução ou suspensão num solvente adequado. Nesses casos, o solvente deve ser removido por evaporação antes da mistura com o solo. De modo a optimizar a distribuição da substância de ensaio no solo, recomenda-se uma relação de 10 g de areia por quilograma de solo (peso seco). As amostras de controlo são tratadas com uma quantidade equivalente de água ou de areia de quartzo (sem adição de substância de ensaio).

Nos ensaios de produtos químicos voláteis importa, tanto quanto possível, evitar perdas durante o tratamento e procurar assegurar a homogeneidade da distribuição dos produtos no solo (por exemplo, as substâncias de ensaio devem ser injectadas em diferentes locais do solo).

1.6.6. **Concentrações de ensaio**

Nos ensaios de produtos químicos agrícolas devem ser usadas pelo menos duas concentrações. A concentração inferior deve reflectir, no mínimo, a quantidade máxima que se espera que, na prática, venha a atingir o solo, enquanto a concentração mais elevada deve ser um múltiplo da concentração inferior. As concentrações da substância de ensaio adicionada ao solo são calculadas assumindo uma incorporação uniforme até uma profundidade de 5 cm e uma densidade aparente do solo de 1,5. Para produtos químicos agrícolas que são aplicados directamente no solo ou para compostos químicos cuja quantidade que atinge o solo pode ser prevista, as concentrações recomendadas são a máxima concentração prevista no ambiente («predicted environmental concentration», PEC) e cinco vezes o valor dessa concentração. Nos casos em que se prevê que as substâncias sejam aplicadas diversas vezes no solo durante uma mesma estação, devem ser efectuados ensaios a concentrações correspondentes à multiplicação da PEC pelo número máximo de aplicações previsto. Contudo, a concentração máxima de ensaio não deve exceder dez vezes a taxa máxima para uma única aplicação. Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas. deve ser usada uma série geométrica de, pelo menos, cinco concentrações. As concentrações usadas devem cobrir a gama necessária para os cálculos dos valores de CE_x.

▼B

1.7. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1.7.1. **Condições de Exposição**

1.7.1.1. *Tratamento e Controlo*

Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, o solo é dividido em três porções de igual peso. Duas porções são misturadas com o excipiente contendo o produto e a terceira é misturada apenas com o excipiente (amostra de controlo). Recomenda-se um mínimo de três repetições para ambos os solos, tratado e de controlo. Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas, o solo é dividido em seis porções de igual peso. Cinco das amostras são misturadas com o excipiente contendo o produto e a sexta é misturada com o excipiente não activado. Recomendam-se três repetições para ambos os solos, tratado e de controlo. Devem ser tomadas precauções de modo a assegurar uma distribuição homogénea da substância de ensaio nas amostras de solo tratadas. Durante a mistura deve evitar-se a aglomeração ou compactação do solo.

1.7.1.2. *Incubação das amostras de solo*

A incubação das amostras de solo pode ser realizada de duas formas: usando cada um dos solos, tratado e de controlo, como amostras únicas ou dividindo-os numa série de subamostras individualizadas e de igual peso. Contudo, no caso de substâncias voláteis, os ensaios devem ser realizados obrigatoriamente na forma de séries de subamostras individuais. Quando os solos são incubados como amostras únicas, preparam-se grandes quantidades de cada solo, tratado e de controlo, e vão-se retirando subamostras para análise, conforme necessário, ao longo do ensaio. A quantidade de solo inicialmente preparada para cada tratamento e para cada controlo depende do tamanho das subamostras a retirar durante o ensaio, do número de repetições a realizar e do número máximo de tempos de amostragem previsto. Os solos incubados como amostras únicas devem ser misturados vigorosamente antes de cada subamostragem. Quando os solos são incubados como uma série de amostras individualizadas, cada solo tratado e de controlo é inicialmente dividido no número de subamostras pretendido e estas utilizadas conforme necessário. Nas experiências em que se prevêem mais de dois tempos de amostragem, devem preparar-se subamostras em número suficiente para todas as repetições de todas as amostragens. Pelo menos, três repetições do solo de ensaio devem ser incubadas em condições aeróbias (ver secção 1.7.1.1). Os recipientes utilizados durante todos os testes devem possuir um volume livre suficiente para impedir o desenvolvimento de condições anaeróbias. Nos casos em que as substâncias de ensaio são voláteis, o ensaio só deve ser realizado com séries de subamostras individualizadas.

1.7.1.3. *Condições e duração dos ensaios*

O ensaio é realizado em câmara escura à temperatura de 20±2 ºC. Durante o ensaio, o teor de humidade das amostras de solo deve. ser mantido entre 40 % e 60 % da capacidade máxima de retenção de água do solo (ver secção 1.6.4.2), com uma variação máxima de ±5 %. Sempre que necessário, pode adicionar-se água destilada ou desionizada.

A duração mínima do ensaio é de 28 dias. Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, comparam-se as taxas de formação de nitratos nas amostras tratadas e de controlo. Se estes valores diferirem em mais de 25 % após o 28.º dia, o ensaio continua até que essa diferença atinja um valor igual ou inferior a 25 % ou até ao 100.º dia. Para compostos químicos não agrícolas, o ensaio tem a duração de 28 dias. No 28.º dia, determinam-se as quantidades de nitratos nas amostras de solo tratadas e de controlo e calculam-se os valores de CE_x.

▼B

1.7.2. **Amostragem e análise dos solos**

1.7.2.1. *Calendário de amostragem dos solos*

Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, analisa-se a quantidade de nitratos nas amostras de solo nos dias 0, 7, 14 e 28. Caso seja necessário prolongar o ensaio, após o 28.º dia devem efectuar-se medições com intervalos de 14 dias.

Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas, testa-se um mínimo de cinco concentrações de ensaio e a análise de nitratos nas amostras de solo efectua-se no início (dia 0) e no fim do período de exposição (28.º dia). Nos casos em que tal se revele necessário, podem realizar-se medições intermédias — por exemplo, ao 7.° dia. Os dados obtidos ao 28.° dia são utilizados para determinar o valor de CE_X para o produto químico. Se desejado, os dados obtidos para a amostra de controlo no dia 0 podem ser utilizados para indicar a quantidade inicial de nitratos no solo.

1.7.2.2. *Análise das amostras de solo*

Para cada repetição de cada amostra de solo, tratada e de controlo, determina-se a quantidade de nitratos formada em cada tempo de amostragem. Os nitratos são removidos do solo por agitação das amostras num solvente de extracção adequado — por exemplo, uma solução 0,1 M de cloreto de potássio. Recomenda-se uma razão de 5 ml de solução de KCl por equivalente de grama de solo (peso seco). Para optimizar a extracção, a mistura da amostra de solo com a solução de extracção não deve ocupar mais de metade do volume do recipiente de extracção. As misturas são agitadas a 150 rpm durante 60 minutos e em seguida centrifugadas ou filtradas, sendo a fase líquida resultante analisada para detecção de nitratos. Os extractos líquidos livres de partículas sólidas podem ser armazenados antes de analisados, devendo ser mantidos a 20±5 ºC negativos até um máximo de seis meses.

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DE RESULTADOS

Nos ensaios efectuados com produtos químicos agrícolas, regista-se a quantidade de nitratos formada em cada repetição de cada amostra de solo e os valores médios do conjunto de repetições devem ser apresentados numa tabela. As taxas de transformação de azoto devem ser analisadas usando métodos estatísticos usuais e adequados (por exemplo, Teste-F, nível de significância de 5 %). As quantidades de nitratos formados expressam-se em mg nitrato/kg solo (peso seco)/dia. A taxa de formação de nitratos em cada tratamento é comparada com a da respectiva amostra de controlo, calculando-se o desvio, em percentagem, da amostra de teste relativamente ao controlo.

Nos ensaios efectuados com produtos químicos não agrícolas, determina-se a quantidade de nitratos formados em cada repetição e traça-se uma curva de dose-resposta para estimar os valores de CE_x. As quantidades de nitratos — isto é, mg nitrato/kg solo (peso seco) — obtidas para as amostras tratadas, após 28 dias são comparadas com as quantidades obtidas para as amostras de controlo. A partir destes resultados, calcula-se a percentagem de inibição para cada concentração de ensaio. As percentagens obtidas são representadas num gráfico em função da concentração e, usando procedimentos estatísticos, determinam-se os valores de CE_X. Os limites de confiança ($p = 0,95$) para os valores de CE_x calculados são igualmente determinados usando métodos-padrão (10) (11) (12).

No caso de conterem quantidades elevadas de azoto, as substâncias de ensaio podem contribuir para as quantidades de nitratos formadas durante o ensaio. Por este motivo, em ensaios com elevadas concentrações dessas substâncias (por exemplo, compostos químicos que se prevê que venham a ser usados em aplicações repetidas), devem ser incluídas amostras de controlo adequadas (isto é, uma mistura de solo com a substância de ensaio, sem a farinha vegetal). Os dados dessas amostras de controlo devem ser tidos era conta nos cálculos de CE_x.

▼B

2.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Quando, na avaliação dos resultados dos ensaios com produtos químicos agrícolas, a diferença entre as taxas de formação de nitratos entre o tratamento com a menor concentração (isto é, correspondente à máxima concentração prevista para a situação real) e a respectiva amostra de controlo for igual ou inferior a 25 % em qualquer amostragem efectuada após o 28.° dia, o produto pode ser considerado como não tendo influência a longo prazo na transformação de azoto dos solos. Para ensaios envolvendo produtos químicos não agrícolas, os valores CE50, CE_{25} ou CE_{10} são utilizados como indicadores.

3. **RELATÓRIO**

O relatório do ensaio deve incluir a seguinte informação:

Identificação completa do solo utilizado, incluindo:

— referência geográfica do local (latitude, longitude),

— informação sobre a caracterização histórica do local (isto é, coberto vegetal, tratamentos com produtos de protecção das culturas agrícolas, tratamentos com fertilizantes, contaminações acidentais, etc.),

— uso do solo (por exemplo, solo agrícola, floresta, etc.),

— profundidade de amostragem (cm),

— teor de areia/lama/argila (% peso seco),

— pH (em água),

— teor de carbono orgânico (% peso seco),

— teor de azoto (% peso seco),

— concentração inicial de nitratos (mg nitratos/kg peso seco),

— capacidade de permuta catiónica (mmol/kg),

— biomassa microbiana, em termos de percentagem de carbono orgânico total,

— referência dos métodos usados na determinação de cada parâmetro,

— toda a informação relacionada com a recolha e armazenamento das amostras de solo,

— pormenores sobre a pré-incubação do solo, quando existir.

Substância de ensaio:

— natureza física e, quando relevante, propriedades físico-químicas,

— dados de identificação química, sempre que relevantes, incluindo fórmula estrutural, pureza (teor do componente activo, em percentagem, no caso dos produtos de protecção das culturas agrícolas), teor de azoto.

Substrato:

— origem do substrato,

— composição (isto é, farinha de luzerna, farinha de luzerna-erva-relva),

— teor de carbono e azoto (% peso seco),

— diâmetro dos peneiras (mm).

▼B

Condições de ensaio:

— pormenores sobre a adição de substrato orgânico ao solo,

— número de concentrações do produto químico de ensaio que foram testadas e, quando adequado, justificação das concentrações de ensaio escolhidas,

— pormenores sobre a aplicação da substância de ensaio no solo,

— temperatura de incubação,

— teor de humidade do solo no início e durante o ensaio,

— método usado na incubação do solo (isto é, como amostra única ou como séries de subamostras individualizadas),

— número de repetições,

— tempos de amostragem,

— método usado para extracção de nitratos do solo;

Resultados:

— procedimento analítico e equipamento usado na análise de nitratos,

— tabelas de resultados, incluindo valores individuais e valores médios para as medições de nitratos,

— variação entre repetições nas amostras tratadas e nas amostras de controlo,

— explicação das correcções efectuadas nos cálculos, quando relevantes,

— a variação percentual da taxa de formação de nitratos em cada ponto de amostragem ou, quando adequado, o valor de CE_{50} com um limite de confiança de 95 %, outros valores de CE_x (isto é, CE_{25} ou CE_{10}), com os respectivos intervalos de confiança, e a representação gráfica da curva de dose-resposta,

— tratamento estatístico dos resultados,

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

4. **REFERÊNCIAS**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Capítulo 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2.ª edição, 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. 28 de Setembro de 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M. R. Lynch, Pub. SETAC-Europa, Bruxelas.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Comité Técnico ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality — Biological Methods.*

▼B

(6) OCDE (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Itália, 18-20 de Janeiro de 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(10) Litchfield, J. T. e Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(11) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3.ª edição, Cambridge, Londres e Nova Iorque.

(12) Finney, D. J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, Reino Unido.

▼B

C.22. MICROORGANISMOS DO SOLO: ENSAIO DE TRANSFORMAÇÃO DE CARBONO

1. MÉTODO

O presente método de ensaio baseia-se na publicação OCDE TG 217 (1999).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio descreve um método laboratorial concebido para a investigação dos potenciais efeitos, a longo prazo, resultantes de uma única exposição a produtos de protecção de culturas agrícolas, e possivelmente outras substâncias químicas, na capacidade de transformação do carbono pelos microorganismos do solo. O ensaio baseia-se, fundamentalmente, nas recomendações da Organização Europeia e Mediterrânica para a Protecção das Plantas (1), embora tenham sido igualmente consideradas outras linhas de orientação, nomeadamente as fornecidas pelas seguintes organizações: Biologische Bundesanstalt da Alemanha (2); Agência de Protecção do Ambiente dos EUA (3) e SETAC (4). As orientações respeitantes ao número e tipo de solos a utilizar neste ensaio são as acordadas na reunião de trabalho da OCDE sobre Selecção de Solos/Sedimentos que decorreu em Belgirate, Itália, em 1995 (5). As recomendações respeitantes à recolha, manuseamento e armazenamento de amostras de solos baseiam-se nas normas ISO 10381-6 (6) e nas recomendações da reunião de Belgirate.

A determinação e avaliação das características de toxicidade de determinadas substâncias de ensaio poderão requerer a determinação dos seus efeitos sobre a actividade microbiana dos solos, por exemplo, quando se pretende conhecer os potenciais efeitos secundários de produtos utilizados na protecção de culturas agrícolas sobre a microflora do solo ou quando se prevê a exposição dos microorganismos do solo a outro tipo de substâncias químicas. O ensaio de transformação de carbono aplica-se na determinação dos efeitos destes produtos sobre a microflora do solo. No ensaio de produtos químicos agrícolas (por exemplo, produtos de protecção de culturas, fertilizantes, químicos florestais) devem realizar-se os ensaios de transformação de carbono e de transformação de azoto. Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas, considera-se suficiente a realização do ensaio de transformação de azoto, ressalvando-se os casos em que os valores de CE_{50} obtidos no ensaio de transformação de azoto se encontrem dentro dos valores correspondentes aos inibidores de nitrificação comerciais (por exemplo, nitrapirina), casos em que deve ser efectuado um ensaio de transformação de carbono no sentido de se obter informação adicional.

Os solos são misturas complexas e heterogéneas de elementos vivos e não vivos. Os microorganismos desempenham um papel importante na decomposição e transformação da matéria orgânica em solos férteis através de processos complexos em que diversas espécies contribuem de forma distinta para cada um dos factores que determinam a fertilidade do solo. Por este motivo, qualquer interferência a longo prazo nos processos bioquímicos envolvidos constitui uma potencial interferência nos ciclos nutricionais, podendo vir a afectar a fertilidade do solo. A transformação de carbono e de azoto ocorre em todos os solos férteis e, ainda que as comunidades de microorganismos responsáveis por estes processos divirjam de solo para solo, as vias e processos de transformação são essencialmente os mesmos.

▼B

O Método de Ensaio aqui descrito foi desenvolvido com o objectivo de determinar os efeitos adversos a longo prazo de uma substância, no processo de transformação de carbono em solos aeróbios de superfície. O ensaio é sensível a alterações na dimensão e actividade das comunidades microbianas responsáveis pela transformação do carbono, na medida em que sujeita essas comunidades simultaneamente a condições de stress químico e de privação de carbono. Utiliza-se um solo arenoso pobre em matéria orgânica. O solo é tratado com a substância de ensaio e incubado em condições tais que permitem um rápido metabolismo microbiano, e sob as quais as fontes de carbono acessíveis no solo se esgotam rapidamente. O processo provoca o empobrecimento de carbono, causando simultaneamente a morte das células microbianas e a indução do estado de letargia ou esporulação. Se o teste decorrer durante um período superior a 28 dias, o somatório destas reacções pode ser medido em amostras de controlo (solo não tratado) como uma perda progressiva da biomassa microbiana metabolicamente activa (7). Se a biomassa de um solo em stress por privação de carbono, nas condições de ensaio, é afectada pela presença de um produto químico, a recuperação do solo poderá não se verificar até ao mesmo nível que o solo de controlo. Por este motivo, as perturbações causadas pela substância de ensaio, em qualquer momento do ensaio, mantêm-se geralmente até ao final do mesmo.

Os ensaios que serviram de base ao presente Método de Ensaio foram inicialmente desenvolvidos para substâncias relativamente às quais é possível estimar a quantidade de substância que atinge o solo. É o caso, por exemplo, dos produtos utilizados para a protecção de culturas agrícolas, uma vez que é conhecida a sua taxa de aplicação nos campos. No caso de produtos químicos agrícolas, considera-se suficiente o ensaio de duas doses relevantes, relativamente à taxa de aplicação estimada ou prevista. Os produtos químicos agrícolas podem ser testados como ingredientes activos (i.a.) ou como formulações. A aplicação deste ensaio não se limita, no entanto, a produtos químicos agrícolas. Fazendo variar simultaneamente a quantidade de substância de ensaio aplicada no solo e o método de avaliação dos dados, o ensaio poderá ser igualmente utilizado em situações em que não é conhecida a quantidade de produto químico que atinge o solo. Deste modo, para produtos químicos não agrícolas, deverão determinar-se os efeitos de uma série de concentrações sobre a transformação de carbono e utilizar-se os dados obtidos nesses ensaios para construir uma curva de dose-resposta, a partir da qual se calculam os valores de CE_x, em que x corresponde à percentagem de efeito.

1.2. DEFINIÇÕES

Transformação de carbono: é a degradação da matéria orgânica por microorganismos até formar um produto final inorgânico, o dióxido de carbono.

EC_x (Concentração Efectiva): é a concentração da substância de ensaio no solo que resulta numa percentagem x de inibição da transformação de carbono em dióxido de carbono.

EC_{50} (Concentração Média Efectiva): é a concentração da substância de ensaio no solo que resulta em 50 % de inibição da transformação de carbono em dióxido de carbono.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

▼B

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O solo peneirado é tratado com a substância de ensaio ou deixado por tratar (controlo). No ensaio de produtos químicos agrícolas recomenda-se o teste de um mínimo de duas concentrações, que deverão ser escolhidas tendo em conta a maior concentração de substância que se prevê que venha a ser aplicada no campo. Após 0, 7, 14 e 28 dias de incubação, amostras do solo tratadas e de controlo são misturadas com glucose e a taxa de respiração induzida pela glucose é medida durante 12 horas consecutivas. As taxas de respiração são expressas em termos de dióxido de carbono libertado (mg dióxido de carbono/kg solo seco/h) ou de oxigénio consumido (mg oxigénio/kg solo/h). A taxa média de respiração nas amostras tratadas é comparada com a das respectivas amostras de controlo e calcula-se a percentagem de desvio das amostras tratadas relativamente às de controlo. Todos os ensaios têm uma duração mínima de 28 dias. Se ao 28.º dia as diferenças entre as amostras tratadas e as amostras não tratadas forem iguais ou superiores a 25 %, devem continuar a efectuar-se medições, em intervalos de 14 dias, até ao limite de 100 dias. Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas, adiciona-se uma série de concentrações da substância de ensaio a amostras de solo e medem-se as taxas de respiração induzida por glucose (isto é, a média das quantidades de dióxido de carbono formado ou de oxigénio consumido) após 28 dias. Os resultados dos ensaios com múltiplas concentrações são analisados através de um modelo de regressão, com base no qual se calculam os valores de CE_x (isto é: CE_{50}, CE_{25} ou CE_{10}). Ver definições.

1.5. VALIDADE DO ENSAIO

As análises dos resultados dos ensaios com produtos químicos agrícolas baseiam-se em diferenças relativamente pequenas (isto é, com um valor médio de ± 25 %) entre as quantidades de dióxido de carbono libertado ou de oxigénio consumido nas (ou pelas) amostras de solo tratadas e nas (ou pelas) amostras de controlo. Por este motivo, e uma vez que grandes variações entre as amostras de controlo podem conduzir a resultados falsos, a variação entre repetições das amostras de controlo deve ser inferior a ± 15 %.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Equipamento**

Os recipientes utilizados durante o ensaio devem ser de materiais quimicamente inertes e ter uma capacidade adequada ao método usado na incubação dos solos, isto é, a granel ou numa série de amostras de solo individualizadas (ver secção 1.7.1.2). Devem tomar-se precauções no sentido de minimizar as perdas de água e permitir trocas gasosas durante o ensaio (por exemplo, os recipientes de ensaio podem ser cobertos com folhas de polietileno perfuradas). Para o ensaio de substâncias voláteis, devem ser usados recipientes seláveis e estanques com dimensões que permitam que aproximadamente um quarto do seu volume seja ocupado pela amostra de solo.

Para a determinação da taxa de respiração induzida pela glucose, são necessários sistemas de incubação e instrumentos para medir a produção de dióxido de carbono ou o consumo de oxigénio. Na literatura encontram-se exemplos destes sistemas e instrumentos (8) (9) (10) (11).

1.6.2. **Selecção e número de solos**

No presente ensaio utiliza-se um único solo, cujas características recomendadas são as seguintes:

— teor de areia: não inferior a 50 % e não superior a 75 %;

▼B

— pH: 5,5 a 7,5;

— teor de carbono orgânico: 0,5 a 1,5 %;

— a biomassa microbiana deve ser medida (12)(13) e o seu teor de carbono deve corresponder, no mínimo, a 1 % do carbono orgânico total do solo.

Na maioria dos casos, um solo com estas características representa a situação menos favorável, uma vez que nestas condições a adsorção da substância química de ensaio é mínima e a sua disponibilidade para a microflora é máxima. Por este motivo, a realização de ensaios com outros solos é geralmente desnecessária. Contudo, em determinadas circunstâncias, por exemplo, quando se prevê que a substância de ensaio venha a ser principalmente utilizada em solos específicos, tais como solos florestais acídicos, ou para produtos químicos com carga electrostática, poderá ser necessário utilizar um outro tipo de solo.

1.6.3. **Recolha e armazenamento das amostras de solo**

1.6.3.1. *Recolha*

Deve existir, e estar disponível, informação pormenorizada sobre a história do local donde foram recolhidas as amostras de solo para o ensaio. A informação necessária inclui a localização exacta, o coberto vegetal, as datas dos tratamentos com produtos utilizados para a protecção de culturas agrícolas, dos tratamentos com fertilizantes orgânicos e inorgânicos, das aplicações de materiais biológicos ou de contaminações acidentais. Deverá ser escolhido, para a recolha de solo, um local que permita o seu uso a longo prazo. Consideram-se locais adequados: as pastagens permanentes, os campos com culturas anuais de cereais (à excepção de milho) ou os campos densamente semeados para produção de adubo verde. No local escolhido para a amostragem não devem ter sido aplicados produtos de protecção de culturas agrícolas, pelo menos, durante o último ano, nem nenhum fertilizante orgânico, pelo menos, nos últimos seis meses. O uso de fertilizantes minerais apenas poderá ser aceite quando em concordância com as necessidades das culturas agrícolas e, nesse caso, a recolha de amostras de solo não deverá ser efectuada antes de passados três meses após a aplicação do fertilizante. Deve ser evitado o uso de solos tratados com fertilizantes que tenham efeitos biocidas conhecidos (por exemplo, cianamida de cálcio).

Deve ser evitada a recolha de amostras durante, ou imediatamente após, períodos longos (superiores a 30 dias) de seca ou de exploração de águas. Em solos lavrados, as amostras devem ser recolhidas a uma profundidade de 0 a 20 cm. Nas pastagens ou outros solos que não são lavrados durante períodos longos (pelo menos, uma época de cultivo), a profundidade máxima de amostragem pode ser ligeiramente superior a 20 cm (por exemplo, até 25 cm). As amostras de solo devem ser transportadas em recipientes adequados e em condições de temperatura que garantam que as propriedades iniciais do solo não são alteradas de forma significativa.

1.6.3.2. *Armazenamento*

Sempre que possível, é preferível a utilização de amostras de solos recolhidas na altura. Nos casos em que o armazenamento em laboratório não possa ser evitado, os solos devem ser armazenados no escuro, a uma temperatura de 4±2 ºC e por um período máximo de três meses. Durante o armazenamento dos solos, devem ser asseguradas condições aeróbias. Se os solos forem recolhidos em zonas onde permanecem gelados por períodos iguais ou superiores a três meses por ano, poderá ser considerada a hipótese do seu armazenamento durante seis meses a uma temperatura de 18 °C negativos. A biomassa microbiana de solos armazenados é medida antes de cada experiência e o teor de carbono na biomassa não deverá ser inferior a 1 % do teor total de carbono orgânico no solo (ver secção 1.6.2).

▼B

1.6.4. **Manuseamento e preparação do solo para o ensaio**

1.6.4.1. *Pré-incubação*

Se o solo esteve armazenado (ver secção 1.6.3.2), recomenda-se um período de pré-incubação de 2 a 28 dias. A temperatura e a humidade do solo durante a pré-incubação e o ensaio devem ser idênticas às utilizadas durante o ensaio (ver secções 1.6.4.2 e 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Características físico-químicas*

Os objectos de grandes dimensões (por exemplo, pedras, pedaços de plantas, etc.) são removidos manualmente do solo e a amostra é peneirada húmida, evitando a dessecação excessiva, de forma a reduzir as partículas a uma dimensão máxima de 2 mm. O teor de humidade da amostra de solo deve ser ajustado com água destilada ou desionizada para um valor entre 40 % e 60 % da sua capacidade máxima de retenção de água.

1.6.5. **Preparação da substância de ensaio para aplicação no solo**

A aplicação da substância de ensaio no solo envolve, geralmente, a utilização de um excipiente (matriz de transporte), que pode ser água (para substâncias hidrossolúveis) ou um sólido inerte, como, por exemplo, areia fina de quartzo (tamanho de partículas: 0,1 a 0,5 mm). A utilização de outros excipientes líquidos (por exemplo, solventes orgânicos, como acetona, clorofórmio) deve ser evitada devido à possibilidade de virem a afectar a microflora. Nos casos em que se use areia como excipiente, esta pode ser coberta com a substância de ensaio em solução ou suspensão num solvente adequado. Nesses casos, o solvente deve ser removido por evaporação antes da mistura com o solo. De modo a optimizar a distribuição da substância de ensaio no solo, recomenda-se uma relação de 10 g de areia por quilograma de solo (peso seco). As amostras de controlo são tratadas com uma quantidade equivalente de água ou de areia de quartzo (sem adição de substância de ensaio).

Nos ensaios de produtos químicos voláteis importa, tanto quanto possível, evitar perdas durante o tratamento e procurar assegurar a homogeneidade da distribuição dos produtos no solo (por exemplo, as substâncias de ensaio devem ser injectadas em diferentes locais do solo).

1.6.6. **Concentrações de ensaio**

Nos ensaios de produtos utilizados para protecção de culturas agrícolas, ou outros produtos químicos cujas concentrações ambientais possam ser previstas, devem ser usadas, pelo menos, duas concentrações. A concentração inferior deve reflectir, no mínimo, a quantidade máxima que se espera que, na prática, venha a atingir o solo, enquanto a concentração mais elevada deve ser um múltiplo da concentração inferior. As concentrações da substância de ensaio adicionada ao solo são calculadas assumindo uma incorporação uniforme até uma profundidade de 5 cm e uma densidade aparente do solo de 1,5. Para produtos químicos agrícolas que são aplicados directamente no solo ou para compostos químicos cuja quantidade que atinge o solo pode ser prevista, as concentrações recomendadas são a máxima concentração prevista no ambiente («predicted environmental concentration», PEC) e cinco vezes o valor dessa concentração. Nos casos em que se prevê que as substâncias sejam aplicadas diversas vezes no solo durante uma mesma estação, devem ser efectuados ensaios a concentrações correspondentes à multiplicação da PEC pelo número máximo de aplicações previsto. Contudo, a concentração máxima de ensaio não deve exceder dez vezes a taxa máxima para uma única aplicação.

Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas deve ser usada uma série geométrica de, pelo menos, cinco concentrações. As concentrações usadas devem cobrir a gama necessária para os cálculos dos valores de CE_x.

▼B

1.7. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1.7.1. **Condições de Exposição**

1.7.1.1. *Tratamento e Controlo*

Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, o solo é dividido em três porções de igual peso. Duas porções são misturadas com o excipiente contendo o produto e a terceira é misturada apenas com o excipiente (amostra de controlo). Recomenda-se um mínimo de três repetições para ambos os solos, tratado e de controlo. Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas, o solo é dividido em seis porções de igual peso. Cinco das amostras são misturadas com o excipiente contendo o produto e a sexta é misturada com o excipiente não activado. Recomendam-se três repetições para ambos os solos, tratado e de controlo. Devem ser tomadas precauções de modo a assegurar uma distribuição homogénea da substância de ensaio nas amostras de solo tratadas. Durante a mistura deve evitar-se a aglomeração ou compactação do solo.

1.7.1.2. *Incubação das amostras de solo*

A incubação das amostras de solo pode ser realizada de duas formas: usando cada um dos solos, tratado e de controlo, como amostras únicas, ou dividindo-os numa série de subamostras individualizadas e de igual peso. Contudo, no caso de substâncias voláteis, os ensaios devem ser realizados obrigatoriamente na forma de séries de subamostras individuais. Quando os solos são incubados como amostras únicas, preparam-se grandes quantidades de cada solo, tratado e de controlo, e vão-se retirando subamostras para análise, conforme necessário, ao longo do ensaio. A quantidade de solo inicialmente preparada para cada tratamento e para cada controlo depende do tamanho das subamostras a retirar durante o ensaio, do número de repetições a realizar e do número máximo de tempos de amostragem previsto. Os solos incubados como amostras únicas devem ser misturados vigorosamente antes de cada subamostragem. Quando os solos são incubados como uma série de amostras individualizadas, cada solo tratado e de controlo é inicialmente dividido no número de subamostras pretendido e estas utilizadas conforme necessário. Nas experiências em que se prevêem mais de dois tempos de amostragem, devem preparar-se subamostras em número suficiente para todas as repetições de todas as amostragens. Pelo menos, três repetições do solo de ensaio devem ser incubadas em condições aeróbias (ver secção 1.7.1.1). Os recipientes utilizados durante todos os testes devem possuir um volume livre suficiente para impedir o desenvolvimento de condições anaeróbias. Nos casos em que as substâncias de ensaio são voláteis, o ensaio só deve ser realizado com séries de subamostras individualizadas.

1.7.1.3. *Condições e duração dos ensaios*

O ensaio é realizado em câmara escura à temperatura de 20 ± 2 ºC. Durante o ensaio, o teor de humidade das amostras de solo deve ser mantido entre 40 % e 60 % da capacidade máxima de retenção de água do solo (ver secção 1.6.4.2), com uma variação máxima de ± 5 %. Sempre que necessário, pode adicionar-se água destilada ou desionizada.

A duração mínima do ensaio é de 28 dias. Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, comparam-se as quantidades de dióxido de carbono libertado ou de oxigénio consumido entre as amostras tratadas e de controlo. Se estes valores diferirem em mais de 25 % após o 28.º dia, o ensaio continua até que essa diferença atinja um valor igual ou inferior a 25 % ou até ao 100.º dia. Para compostos químicos não agrícolas, o ensaio tem a duração de 28 dias. No 28.º dia, determinam-se as quantidades de dióxido de carbono libertado ou de oxigénio consumido nas amostras de solo tratadas e de controlo e calculam-se os valores de CE_X.

▼B

1.7.2. **Amostragem e análise dos solos**

1.7.2.1. *Calendário de amostragem dos solos*

Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, analisam-se as taxas de respiração induzida pela glucose através das quantidades de dióxido de carbono libertado ou de oxigénio consumido nas amostras de solo nos dias 0, 7, 14 e 28. Caso seja necessário prolongar o ensaio, após o 28.º dia devem efectuar-se medições com intervalos de 14 dias.

Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas, testa-se um mínimo de cinco concentrações de ensaio e a análise da taxa de respiração induzida pelo glucose efectua-se no início do ensaio (dia 0) e no fim do período de exposição (28.º dia). Nos casos em que tal se revele necessário, podem realizar-se medições intermédias — por exemplo ao 7.º dia. Os dados obtidos ao 28.° dia são utilizados para determinar o valor de CE_x para o produto químico. Se desejado, os dados obtidos para a amostra de controlo no dia 0 podem ser utilizados para indicar as quantidades iniciais de biomassa microbiana metabolicamente activa no solo (12).

1.7.2.2. *Medida das taxas de respiração induzida por glucose*

Para cada repetição de cada amostra de solo, tratada e de controlo, determina-se a taxa de respiração induzida por glucose em cada tempo de amostragem. As amostras de solo são misturadas com uma quantidade de glucose suficiente para provocar uma resposta máxima de respiração imediata. A quantidade de glucose necessária para provocar a resposta máxima de respiração de um dado solo pode ser determinada através de um teste preliminar usando uma série de concentrações de glucose (14). Contudo, para solos arenosos com 0,5 a 1,5 % de carbono orgânico, 2 000 a 4 000 mg de glucose por kg de solo (peso seco) são, em geral, suficientes. A glucose pode ser pulverizada com areia limpa de quartzo [10 g areia/kg de solo (peso seco)] e misturada com o solo de forma homogénea.

As amostras de solo adicionadas de glucose são incubadas num aparelho adequado para a determinação de taxas de respiração, em regime contínuo, de hora a hora ou de duas em duas horas (ver secção 1.6.1) a 20±2 ºC. O dióxido de carbono libertado, ou o oxigénio consumido, é medido durante 12 horas consecutivas e as medições devem iniciar-se logo que possível, isto é, 1 ou 2 horas após o suplemento de glucose. A partir dos dados obtidos, determinam-se as quantidades totais de dióxido de carbono libertado, ou de oxigénio consumido, durante as 12 horas, assim como as taxas médias de respiração.

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DE RESULTADOS

Nos ensaios efectuados com produtos químicos agrícolas, regista-se a quantidade de dióxido de carbono libertado, ou de oxigénio consumido, em cada repetição de cada amostra de solo e os valores médios do conjunto de repetições devem ser apresentados numa tabela. Os resultados devem ser avaliados usando métodos estatísticos usuais e adequados (por exemplo, Teste-F, nível de significância de 5 %). As taxas de respiração induzida pela glucose expressam-se em mg dióxido de carbono/kg solo (peso seco)/h ou mg oxigénio/kg solo (peso seco)/h. A taxa média de formação de dióxido de carbono, ou a taxa média de consumo de oxigénio, em cada tratamento é comparada com a da amostra de controlo, calculando-se o desvio, em percentagem, da amostra de teste relativamente ao controlo.

▼B

Nos ensaios efectuados com produtos químicos não agrícolas, determinam-se as quantidades de dióxido de carbono libertado, ou de oxigénio consumido, em cada repetição e traça-se uma curva de dose-resposta para estimar os valores de CE_X. As taxas de respiração induzida pela glucose [isto é, mg dióxido de carbono/kg solo (peso seco)/h ou mg oxigénio/kg solo (peso seco)/h] obtidas para as amostras tratadas após 28 dias são comparadas com as obtidas para as amostras de controlo. A partir destes resultados, calculam-se os valores percentuais de inibição para cada concentração de ensaio. As percentagens obtidas são representadas num gráfico em função da concentração e, usando procedimentos estatísticos, determinam-se os valores de CE_x. Os limites de confiança (p = 0,95) para os valores de CE_x calculados são igualmente determinados usando métodos-padrão (15) (16) (17).

2.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Quando, na avaliação dos resultados dos ensaios com produtos químicos agrícolas, a diferença entre as taxas de respiração entre o tratamento com a menor concentração (isto é, correspondente à máxima concentração prevista para a situação real) e a respectiva amostra de controlo for igual ou inferior a 25 % em qualquer amostragem efectuada após o 28.º dia, o produto pode ser considerado como não tendo influência a longo prazo na transformação de carbono dos solos. Para ensaios envolvendo produtos químicos não agrícolas, os valores CE_{50}, CE_{25} ou CE_{10} são utilizados como indicadores.

3. RELATÓRIO

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir a seguinte informação:

Identificação completa do solo utilizado, incluindo:

— referência geográfica do local (latitude, longitude),

— informação sobre a caracterização histórica do local (isto é, coberto vegetal, tratamentos com produtos de protecção das culturas agrícolas, tratamentos com fertilizantes, contaminações acidentais, etc.),

— uso do solo (por exemplo, solo agrícola, floresta, etc.),

— profundidade de amostragem (cm),

— teor de areia/lama/argila (% peso seco),

— pH (em água),

— teor de carbono orgânico (% peso seco),

— teor de azoto (% peso seco),

— capacidade de permuta catiónica (mmol/kg),

— biomassa microbiana inicial, em termos de percentagem de carbono orgânico total,

— referência dos métodos usados na determinação de cada parâmetro,

— toda a informação relacionada com a recolha e armazenamento das amostras de solo,

— pormenores sobre a pré-incubação do solo, quando exista.

▼B

Substância de ensaio:

— natureza física e, quando relevante, propriedades físico-químicas,

— dados de identificação química, sempre que relevantes, incluindo fórmula estrutural, pureza (teor do componente activo, em percentagem, no caso dos produtos de protecção de culturas agrícolas), teor de azoto.

Condições de ensaio:

— pormenores sobre a correcção do solo com substrato orgânico,

— número de concentrações do produto químico de ensaio que foram testadas e, quando adequado, justificação das concentrações de ensaio escolhidas,

— pormenores sobre a aplicação da substância de ensaio no solo,

— temperatura de incubação,

— teor de humidade do solo no início e durante o ensaio,

— método usado na incubação do solo (isto é, como amostra única ou como séries de subamostras individualizadas),

— número de repetições,

— tempos de amostragem;

Resultados:

— método e equipamento usado para a medição das taxas de respiração,

— tabelas de resultados, incluindo valores individuais e valores médios para as quantidades de dióxido de carbono ou oxigénio,

— variação entre repetições nas amostras tratadas e nas amostras de controlo,

— explicação das correcções efectuadas nos cálculos, quando relevantes,

— a variação percentual da taxa de respiração induzida pela glucose em cada ponto de amostragem ou, quando adequado, o valor de CE_{50} com um limite de confiança de 95 %, ou outros valores de CE_x (isto é, CE_{25} ou CE_{10}), com os respectivos intervalos de confiança, e a representação gráfica da curva de dose-resposta,

— tratamento estatístico dos resultados, quando apropriado,

— toda a informação e observações úteis para a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2.ª edição, 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. 28 de Setembro de 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M. R. Lynch, Pub. SETAC-Europa, Bruxelas.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Itália, 18-20 de Janeiro de 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J. P. E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in «Pesticide Effects on Soil Microflora». Eds. L. Somerville and M. P. Greaves, Capítulo 3: 45-60.

(8) Anderson, J. P. E. (1982). Soil Respiration, in «Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties». Agronomy Monograph Nº 9. Eds. A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeney. 41:831- 871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeye, O., Insam, H., Kaiser, E. A, e Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluβ von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

(15) Litchfield, J. T. e Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(16) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3.ª edição, Cambridge, Londres e Nova Iorque.

(17) Finney D. J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, Reino Unido.

▼B

C.23. TRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS E ANAERÓBIAS NO SOLO

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 307 (2002).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente Método de Ensaio baseia-se nas orientações existentes (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). O método descrito no presente Método de Ensaio foi concebido para avaliar as transformações aeróbias e anaeróbias de produtos químicos no solo. As experiências a realizar têm como objectivo a determinação (i) da taxa de transformação da substância de ensaio e (ii) da natureza e taxas de formação e degradação de produtos de transformação a que as plantas e organismos do solo possam ser expostos. Os estudos descritos neste Método de Ensaio são requeridos quer para produtos químicos directamente aplicados no solo quer para substâncias que o possam vir a atingir. Os resultados dos presentes estudos laboratoriais poderão igualmente vir a ser utilizados para o desenvolvimento de protocolos de amostragem e análise em áreas de estudo relacionadas.

Para a avaliação das vias de transformação, é geralmente suficiente a realização de estudos aeróbios e anaeróbios com um único tipo de solo (8) (10) (11). Pelo contrário, a determinação das taxas de transformação deverá basear-se em análises efectuadas em, pelo menos, mais três solos diferentes (8) (10).

O número e tipos de solos que devem ser utilizados no presente ensaio foram acordados numa reunião de trabalho da OCDE sobre selecção de solos e sedimentos, que decorreu em Belgirate, Itália, em 1995 (10). Os tipos de solos a ensaiar devem ser representativos das condições ambientais onde a substância de ensaio virá a ser utilizada ou libertada no ambiente. Por exemplo, os produtos químicos que podem vir a ser libertados em climas subtropicais a tropicais devem ser ensaiados com Ferrasoles ou Nitosoles (sistema FAO). Da referida reunião saíram igualmente recomendações relativas à recolha, manipulação e armazenamento das amostras de solos, tendo como base a Orientação ISO (15). No presente método considera-se igualmente a utilização de solos de arrozais *paddy*.

1.2. DEFINIÇÕES

Substância de ensaio: Qualquer substância, quer se trate do composto inicial ou de produtos de transformação relevantes.

Produtos de transformação: Todas as substâncias resultantes de reacções de transformação bióticas ou abióticas da substância de ensaio, incluindo CO_2 e produtos presentes nos resíduos ligados.

Resíduos ligados: Os «resíduos ligados» representam compostos presentes no solo, planta ou animal, que, após extracção, persistam na matriz, quer na forma da substância inicial quer como um dos seus metabolitos/produtos de transformação. O método de extracção não poderá alterar substancialmente nem os próprios compostos nem a estrutura da matriz. A natureza da ligação poderá ser parcialmente determinada utilizando métodos extractivos que alterem a matriz e através de técnicas analíticas sofisticadas. Têm sido identificadas deste modo, por exemplo, ligações do tipo covalente, iónico e de absorção/adsorção, assim como encapsulação. De um modo geral, a formação de resíduos ligados reduz significativamente a bioacessibilidade e a biodisponibilidade das substâncias (12) [adaptado de IUPAC 1984 (13)].

Transformação aeróbia: Reacções que ocorrem na presença de oxigénio molecular (14).

▼B

Transformação anaeróbia: Reacções que ocorrem na ausência de oxigénio molecular (14).

Solo: Mistura de componentes abióticos (constituintes químicos minerais e orgânicos, em que os últimos incluem compostos com elevado conteúdo de carbono e azoto e de peso molecular elevado) e bióticos (pequenos organismos vivos, maioritariamente microorganismos). O solo pode ser manuseado em dois estados distintos:

(a) não perturbado, tal como se desenvolveu ao longo do tempo, em camadas características de vários tipos de solos;

(b) perturbado, tal como é normalmente encontrado em campos aráveis ou como se apresenta quando a recolha de amostras para utilização no presente método de ensaio é feita por escavação (14).

Mineralização: Degradação completa de um composto orgânico em CO_2 e H_2O, em condições aeróbias, ou em CH_4, CO_2 e H_2O em condições anaeróbias. No contexto do presente método de ensaio, quando se utiliza um composto marcado com ^{14}C, o termo mineralização refere-se à sua degradação extensa, envolvendo a oxidação de um átomo de carbono marcado e a libertação da quantidade correspondente de $^{14}CO_2$ (14).

Semivida: $t_{0,5}$, é o tempo necessário para a transformação de 50 % da substância de ensaio, nos casos em que a transformação pode ser descrita por uma cinética de primeira ordem. A semivida da substância é independente da sua concentração.

DT_{50} **(Tempo de Desaparecimento 50):** Tempo necessário para reduzir a concentração da substância de ensaio em 50 %; nos casos em que a transformação não segue uma cinética de primeira ordem, o valor de DT_{50} è diferente de $t_{0,5}$ (semivida).

DT_{75} (Tempo de Desaparecimento 75): Tempo necessário para reduzir a concentração da substância de ensaio em 75 %.

DT_{90} (Tempo de Desaparecimento 90): Tempo necessário para reduzir a concentração da substância de ensaio em 90 %.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

A caracterização e/ou identificação dos produtos de transformação através de métodos espectroscópicos e cromatográficos deverá envolver a utilização de substâncias de referência.

1.4. APLICABILIDADE DO ENSAIO

O método é aplicável a todas as substâncias químicas (não marcadas ou marcadas radioactivamente) para as quais se encontre disponível um método analítico suficientemente sensível e preciso. É aplicável a compostos ligeiramente voláteis, não voláteis, solúveis ou insolúveis em água. O ensaio não deve ser aplicado a compostos químicos muito voláteis a partir do solo (por exemplo, fumigantes, solventes orgânicos) já que estes, nas condições experimentais descritas, não podem ser mantidos no solo.

▼B

1.5. INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA DE ENSAIO

Enquanto para a medição da taxa de transformação poderão ser utilizadas substâncias de ensaio marcadas ou não marcadas, para o estudo da via de transformação e para o estabelecimento do balanço de massa é necessária a utilização de compostos marcados. A marcação recomendada é com ^{14}C, embora a utilização de outros isótopos, tais como ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H e ^{32}P, possa igualmente revelar-se útil. A marcação deve ser feita, tanto quanto possível, na(s) zona(s) mais estável(eis) da molécula ([1]). A pureza da substância de ensaio deve ser de, pelo menos, 95 %.

Antes de efectuar um ensaio sobre transformação aeróbia ou anaeróbia no solo, deve estar disponível a seguinte informação sobre a substância de ensaio:

(a) solubilidade em água (Método A.6)

(b) solubilidade em solventes orgânicos;

(c) pressão de vapor (Método A.4) e constante da lei de Henry;

(d) coeficiente de partição n-octanol/água (Método A.8);

(e) estabilidade química no escuro (hidrólise) (Método C.7);

(f) pK_a se a molécula puder sofrer protonação ou desprotonação [Norma de Ensaio 112 da OCDE] (16).

Poderão ser úteis outras informações como, por exemplo, a existência de dados relativos à toxicidade da substância de ensaio para os microorganismos do solo [Métodos de Ensaio C.21 e C.22] (16).

Deverão estar disponíveis métodos analíticos (incluindo métodos de extracção e erradicação) que permitam a quantificação e identificação tanto da substância de ensaio como dos seus produtos de transformação.

1.6. PRINCIPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

As amostras de solo são tratadas com a substância de ensaio e incubadas no escuro em balões biométricos ou em sistemas de fluxo em condições laboratoriais controladas (com temperatura e humidade do solo constantes). A intervalos de tempo adequados, extraem-se amostras de solo que são analisadas relativamente à substância inicial e aos seus produtos de transformação. Os produtos voláteis são igualmente recolhidos para análise utilizando dispositivos de absorção adequados. A utilização de material marcado com ^{I4}C permite a determinação das várias taxas de mineralização da substância de ensaio através da recolha do $^{I4}CO_2$ libertado e o estabelecimento de um balanço de massa que inclui a formação de resíduos ligados ao solo.

1.7. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.7.1. **Recuperação**

A extracção e análise de amostras de solo, pelo menos em duplicado imediatamente após a adição da substância de ensaio, fornece uma primeira indicação relativa à repetitividade do método analítico e à uniformidade do procedimento de aplicação da substância de ensaio. Os valores de recuperação em fases mais adiantadas das experiências são obtidos através dos respectivos balanços de massa. Os valores de recuperação devem variar entre 90 % e 110 % no caso de produtos químicos marcados (8) e entre 70 % e 110 % no caso de produtos químicos não marcados (3).

([1]) Por exemplo, se a estrutura da substância de ensaio inclui um anel, este deverá ser marcado; no caso de a substância de ensaio possuir dois ou mais anéis, poderá ser necessário efectuar estudos independentes de modo a avaliar o destino de cada um dos anéis marcados e obter informação adequada sobre a formação dos produtos de transformação.

▼B

1.7.2. **Repetitividade e sensibilidade do método analítico**

A repetitividade do método analítico (com excepção da eficiência de extracção inicial) na quantificação da substância de ensaio e dos produtos de transformação pode ser verificada pela análise em duplicado do mesmo extracto de solo, após incubação durante o tempo suficiente para que ocorra a formação de produtos de transformação.

O limite de detecção (LD) do método analítico, tanto para a substância de ensaio como para os produtos de transformação, deve corresponder, no mínimo, ao menor dos seguintes valores: 0,01 mg kg^{-1} de solo (como substância de ensaio) ou 1 % da dose aplicada. Deve ser igualmente especificado o limite de quantificação (LQ).

1.7.3. **Precisão dos dados de transformação**

A análise de regressão das concentrações da substância de ensaio em função do tempo fornece informação apropriada sobre a fiabilidade da curva de transformação e permite o cálculo dos limites de confiança para as semividas (no caso de cinética de pseudoprimeira ordem) ou os valores de DT_{50} e, se adequado, os valores de DT_{75} e de DT_{90}.

1.8. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.8.1. **Equipamento e reagentes químicos**

Os sistemas de incubação consistem em sistemas estáticos fechados ou em sistemas de fluxo adequados (7)(17), dos quais se representam exemplos nas figuras 1 (aparelho adequado para a incubação de solos em sistema de fluxo) e 2 (balão biométrico). Ambos os tipos de sistemas de incubação apresentam vantagens e limitações (7)(17).

Para além do material corrente de laboratório, é necessário o seguinte:

— Instrumentos analíticos, tais como equipamento de GLC, HPLC, TLC, incluindo os sistemas de detecção apropriados para a análise de substâncias marcadas radioactivamente ou não marcadas ou o método de diluição inversa de isótopos;

— Instrumentos para fins de identificação (por exemplo, MS, GC--MS, HPLC-MS, NMR, etc.);

— Contador de cintilações;

— Câmara de combustão oxidante para combustão do material radioactivo;

— Centrífuga;

— Aparelhos de extracção (por exemplo, tubos de centrífuga para extracção a frio e aparelho de Soxhlet para extracção contínua em refluxo);

— Instrumentação para concentração de soluções e extractos (por exemplo, evaporador rotativo);

— Banho de água;

— Dispositivo para mistura mecânica (por exemplo, máquina de amassar, misturador rotativo).

▼B

Os reagentes químicos a utilizar incluem, por exemplo:

— NaOH, qualidade analítica, 2 mol . dm^{-3}, ou outra base adequada (por exemplo, KOH, etanolamina);

— H_2SO_4, qualidade analítica, 0,05 mol . dm^{-3};

— Etilenoglicol, qualidade analítica;

— Materiais sólidos de adsorção, tais como cal de soda e pastilhas de poliuretano;

— Solventes orgânicos, qualidade analítica, tais como acetona, metanol, etc.;

— Líquido de cintilação.

1.8.2. **Aplicação da substância de ensaio**

Com vista à sua adição e distribuição no solo, a substância de ensaio pode ser dissolvida em água (desionizada ou destilada) ou, quando necessário, em quantidades mínimas de acetona ou de outros solventes orgânicos (6) em que a substância de ensaio seja suficientemente solúvel e estável. Neste caso, a quantidade do solvente seleccionado não deverá ter uma influência significativa na actividade microbiana do solo (ver secções 1.5 e 1.9.2-1.9.3). Deverá igualmente evitar-se a utilização de solventes que inibam a actividade microbiana, tais como clorofórmio, diclorometano e outros solventes halogenados.

A substância de ensaio pode também ser adicionada na forma sólida, por exemplo, misturada com areia de quartzo (6) ou com uma pequena subamostra do solo a ensaiar que tenha sido previamente seca ao ar e esterilizada. Neste caso, se a substância de ensaio foi adicionada utilizando um solvente, dever-se-á permitir a evaporação deste antes da adição da subamostra contendo a substância de ensaio à amostra original, não estéril, de solo.

No caso de produtos químicos de ocorrência comum, cuja via principal de entrada no solo é através de lamas de esgotos ou actividades agrícolas, a substância de ensaio deverá ser adicionada às lamas que são em seguida introduzidas na amostra de solo (ver secções 1.9.2 e 1.9.3).

Embora a utilização sistemática de produtos formulados não seja recomendada, em algumas situações, como por exemplo, no caso de substâncias de ensaio pouco solúveis, a utilização deste tipo de produtos pode constituir uma alternativa apropriada.

1.8.3. **Solos**

1.8.3.1. *Selecção de solos*

Para a determinação da via de transformação, poderá utilizar-se um solo representativo. Nestes casos, recomenda-se a escolha de um solo areno-limoso, franco-limoso, limoso ou limo-arenoso [de acordo com a classificação da FAO e da USDA (18)] com um pH entre 5,5 - 8,0, um conteúdo de carbono orgânico entre 0,5 - 2,5 % e uma biomassa microbiana de, pelo menos, 1 % do carbono orgânico total (10).

Para estudos de taxas de transformação, devem utilizar-se pelo menos mais três solos, que deverão ser representativos de uma gama de solos relevante e cujo teor em carbono orgânico, pH, argila e biomassa microbiana deverá variar (10).

▼B

Todos os solos deverão ser caracterizados, pelo menos, em relação à sua textura (% de areia, % de silte, % de argila) [de acordo com a classificação da FAO e da USDA (18)], pH, capacidade de troca catiónica, carbono orgânico, densidade aparente, características de retenção de água ([1]) e biomassa microbiana (apenas no caso de estudos aeróbios); no entanto, a disponibilidade de outras informações relativas às propriedades do solo poderá ser útil para a interpretação dos resultados. Com vista à determinação das características 4o solo, podem ser utilizados os métodos recomendados nas referências (19)(20)(21)(22)(23). A biomassa microbiana deverá ser determinada pelo método da respiração induzida pelo substrato (SIR) (25)(26) ou por métodos alternativos (20).

1.8.3.2. *Recolha, manuseamento e armazenamento de solos*

Deve estar disponível informação pormenorizada sobre a história do local de recolha do solo a ensaiar, que inclua: a localização exacta, o coberto vegetal, o eventual tratamento com produtos químicos, fertilizantes orgânicos e inorgânicos, a adição de matéria biológica ou outras contaminações. No caso de terem sido tratados com a substância de ensaio ou seus análogos estruturais nos quatro anos imediatamente anteriores, os solos não devem ser utilizados para estudos de transformação (10) (15),

A amostra de solo deverá ter sido recolhida recentemente (do horizonte A ou até 20 cm da camada superior) e o seu conteúdo de água deverá ser tal que facilite a crivagem. Para outros solos que não os provenientes de arrozais *paddy*, deve evitar-se a amostragem durante ou imediatamente após longos períodos (> 30 dias) de seca, gelo ou inundação (14). Na medida do possível, as amostras devem ser transportadas de modo a minimizar alterações no conteúdo de água do solo e devem ser mantidas no escuro, em condições de boa ventilação. Para este fim, é geralmente adequada a utilização de sacos de polietileno fechados frouxamente.

Após a recolha, o solo deverá ser processado tão depressa quanto possível. Após a remoção da vegetação, fauna macroscópica e pedras, o solo é passado através de um peneiro de 2 mm, que remove as pequenas pedras e restos da fauna e plantas. Antes da crivagem, devem evitar-se a secagem e o esmagamento extensivos do solo (15).

Nos casos em que a recolha das amostras é difícil durante o Inverno (solo congelado ou coberto de camadas de neve), a amostragem poderá ser feita a partir de um lote de solo armazenado numa estufa e coberto por vegetação (por exemplo, erva ou misturas de erva e trevo). Embora haja uma acentuada preferência por estudos efectuados com solos recolhidos na altura, nos casos em que o solo recolhido e processado tenha de ser armazenado antes do início do estudo, as condições de armazenamento devem ser adequadas e de curta duração (4 ± 2 ºC durante três meses, no máximo) de modo a manter a actividade microbiana ([2]). Nas referências (8) (10) (15) (26) (27) podem encontrar-se instruções pormenorizadas sobre a recolha, o manuseamento e o armazenamento de solos para utilização em experiências de biotransformação.

([1]) As características de retenção de água de um solo podem ser medidas como capacidade de campo, capacidade de retenção de água ou tensão de sucção de água (pF). Consultar o apêndice 1 para mais pormenores. No relatório deverá referir-se se as características de retenção de água e densidade aparente dos solos foram determinadas em amostras de campo não perturbadas ou em amostras perturbadas (processadas).

([2]) Resultados de investigações recentes indicam que solos provenientes de zonas temperadas podem igualmente ser armazenados a - 20 ºC durante períodos superiores a três meses (28) (29) sem se registarem perdas significativas de actividade microbiana.

▼B

Antes da utilização do solo processado para o presente ensaio, este deve ser pré-incubado de modo a permitir a germinação e remoção das sementes e o restabelecimento do equilíbrio do metabolismo microbiano após a passagem de condições de amostragem ou armazenamento para condições de incubação. De modo a aproximar as condições de temperatura e humidade daquelas que serão utilizadas no ensaio, a pré-incubação durante um período de 2 a 28 dias) é geralmente adequada (15). No total, os períodos de armazenamento e pré-incubação não devem exceder três meses.

1.9. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1.9.1. **Condições do ensaio:**

1.9.1.1. *Temperatura de ensaio*

Ao longo de todo o período do ensaio, os solos devem ser incubados no escuro e a uma temperatura constante e representativa das condições climáticas onde ocorrerá o uso ou libertação da substância. Relativamente a todas as substâncias de ensaio que possam vir a atingir o solo em climas temperados, a temperatura recomendada é de 20 ± 2 ºC. A temperatura deve ser monitorizada.

No caso de produtos químicos aplicados ou libertados em climas mais frios (por exemplo, em países do Norte, durante o Outono ou o Inverno), devem ser incubadas amostras de solo adicionais a uma temperatura inferior (por exemplo, 10 ±2 ºC).

1.9.1.2. *Teor de humidade*

No caso de ensaios de transformação em condições aeróbias, o teor de humidade do solo ([1]) deve ser ajustado e mantido a um valor de pF entre 2,0 e 2,5 (3). O teor de humidade do solo é expresso em massa de água por massa de solo seco e deve ser controlado regularmente (por exemplo, de 2 em 2 semanas) por pesagem dos balões de incubação, devendo as perdas de água ser compensadas por adição de água (de preferência, água da torneira esterilizada por filtração). Durante a adição de água devem tomar-se precauções com vista a evitar ou minimizar perdas da substância de ensaio e/ou dos produtos de transformação por volatilização e/ou fotodegradação (caso ocorra).

No caso de ensaios de transformação em condições anaeróbias ou de solos *paddy*, o solo é saturado com água por inundação.

1.9.1.3. *Condições de incubação aeróbia*

No caso de sistemas de fluxo, as condições aeróbias serão mantidas através de ciclos de lavagem ou por ventilação contínua com ar humidificado. No caso de balões biométricos, a permuta de a ré mantida por difusão.

1.9.1.4. *Condições aeróbias estéreis*

Com vista à obtenção de informações relativas à relevância da transformação abiótica de uma substância de ensaio, as amostras de solo podem ser esterilizadas (para informações sobre métodos de esterilização, consultar as referências 16 e 29), tratadas com a substância de ensaio estéril (por exemplo, por adição da solução através de um filtro estéril) e arejadas com ar humidificado estéril, tal como descrito na secção 1.9.1.3. No caso de solos *paddy*, tanto o solo como a água devem ser esterilizados e a incubação deve ser efectuada tal como descrito na secção 1.9.1.6.

([1]) O solo não deve estar nem demasiado molhado nem demasiado seco de modo a manter uma ventilação e alimentação adequadas da microflora. Os teores de humidade recomendados para um crescimento microbiano óptimo variam entre 40 % e 60 % da capacidade de retenção de água (WHC) e entre 0,1 e 0,33 bar (6). Este último intervalo é equivalente a uma gama de pF entre 2,0 e 2,5. No apêndice 2 apresentam-se os teores de humidade típicos para vários tipos de solos.

▼B

1.9.1.5. *Condições de incubação anaeróbia*

De modo a estabelecer e manter condições anaeróbias, o solo tratado com a substância de ensaio é inicialmente incubado em condições aeróbias durante 30 dias, uma semivida ou DT_{50} (escolher a opção mais curta), após o que é coberto de água (camada de água de 1--3 cm) e o sistema de incubação lavado com um gás inerte (por exemplo, azoto ou árgon) ([1]). O sistema de ensaio deve permitir a realização de medições de pH, concentração de oxigénio e potencial redox, e incluir dispositivos de retenção de produtos voláteis. O sistema de balões biométricos deve ser fechado de modo a evitar a entrada de ar por difusão.

1.9.1.6. *Condições de incubação paddy*

De modo a estudar a transformação em solos de arrozais *paddy*, o solo é coberto com uma camada de água de 1-5 cm e a substância de ensaio é aplicada na fase aquosa (9). A profundidade mínima do solo recomendada é de 5 cm. O sistema é ventilado com ar, tal como descrito para as condições aeróbias. Os valores de pH, concentração de oxigénio e potencial redox da camada aquosa devem ser monitorizados e incluídos no relatório. O início dos estudos de transformação deve ser precedido de um período de pré-incubação de, pelo menos, duas semanas (ver secção 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Duração do ensaio*

Os estudos de taxa e via de transformação não devem normalmente exceder 120 dias ([2]) (3) (6) (8), pois após este período é de esperar uma diminuição da actividade microbiana do solo num sistema laboratorial artificial e isolado dos sistemas naturais de reposição de nutrientes. Sempre que seja necessário caracterizar o desaparecimento da substância de ensaio e a formação e desaparecimento dos principais produtos de transformação, os estudos poderão ser prolongados (por exemplo, 6 ou 12 meses) (8). O prolongamento do ensaio deverá ser justificado no relatório de ensaio e acompanhado de medições de biomassa realizadas durante e no final desses períodos.

1.9.2. **Princípio do ensaio**

Em cada balão de incubação (ver figuras 1 e 2 do apêndice 3) coloca-se cerca de 50g a 200 g de solo (peso seco), que é tratado com a substância de ensaio utilizando um dos métodos descritos na secção 1.8.2. Caso se utilizem solventes orgânicos para a aplicação da substância de ensaio, estes devem ser removidos do solo por evaporação. 0 solo deverá ser muito bem mexido, utilizando uma espátula e/ou por agitação do balão. Se o ensaio for conduzido em condições de arrozal *paddy*, o solo e a água devem ser muito bem misturados após a aplicação da substância de ensaio. De modo a verificar a uniformidade da distribuição da substância de ensaio, esta deverá ser analisada em pequenas alíquotas (por exemplo, 1 g) dos solos tratados. Em alternativa, poderá ser utilizado um outro método, que se descreverá mais à frente.

([1]) As condições aeróbias são as que predominam em solos superficiais e mesmo em solos subsuperficiais, tal como foi demonstrado num projecto de investigação financiado pela UE [K. Takagi *et al.* (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Intemat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. A ocorrência de condições anaeróbias é ocasional, verificando-se apenas durante a inundação dos solos após precipitação intensa ou quando são estabelecidas condições *paddy* (em arrozais).

([2]) Os estudos aeróbios poderão ser terminados muito antes de decorridos 120 dias, desde que se tenha manifestamente atingido o final da mineralização e da via de transformação. A conclusão do teste poderá ocorrer após 120 dias ou quando pelo menos 90 % da substância de ensaio tiver sido transformada, mas apenas se se tiver formado, no mínimo, 5 % de CO_2.

▼B

A taxa de tratamento deverá corresponder à maior taxa de aplicação de um produto de protecção de culturas que é recomendada nas instruções de utilização e a uma incorporação uniforme até uma profundidade adequada no campo (por exemplo, camada superficial de 10 cm de solo ([1]). Por exemplo, para produtos químicos aplicados na folhagem ou no solo sem incorporação, a profundidade apropriada para o cálculo de quantidade de produto químico a adicionar a cada balão é de 2,5 cm. No caso de produtos químicos incorporados no solo, a profundidade apropriada é a profundidade de incorporação especificada nas instruções de utilização. No caso de produtos químicos de ocorrência comum, a taxa de aplicação deve ser estimada com base na via de entrada mais relevante. Por exemplo, quando as lamas de esgotos constituem a principal via de entrada no solo, o produto químico deve ser adicionado às lamas a uma concentração que reflecte a sua concentração esperada e a quantidade de lamas adicionadas ao solo deve reflectir a sua carga habitual em solos agrícolas. Se esta concentração não for suficientemente elevada para que se possam identificar os principais produtos de transformação, poderá ser útil a incubação de amostras de solo independentes contendo taxas mais elevadas, embora devam ser evitadas taxas excessivas que possam influenciar as funções microbianas do solo (ver secções 1.5 e 1.8.2).

Alternativamente, poderá tratar-se uma maior quantidade de solo (ou seja, 1 kg a 2 kg) com a substância de ensaio; depois de ser cuidadosamente misturado numa máquina misturadora apropriada, o solo tratado será então dividido em pequenas porções de 50 g a 200 g e transferido para os balões de incubação (por exemplo, utilizando divisores de amostras). Também neste caso deverão ser analisados pequenas alíquotas do lote de solo tratado (por exemplo, 1 g), de modo a determinar a uniformidade da distribuição da substância de ensaio. Este procedimento apresenta a vantagem de permitir uma distribuição mais uniforme da substância de ensaio no solo, pelo que será preferível a sua utilização.

Deverão ser igualmente incubadas, nas mesmas condições (aeróbias), que as amostras tratadas com a substância de ensaio, amostras de solo não tratadas; estas amostras serão utilizadas para medições de biomassa durante e no final dos estudos.

Nos casos em que a substância de ensaio é aplicada no solo dissolvida em solvente(s) orgânico(s), deverão ser incubadas, nas mesmas condições (aeróbias) que as amostras tratadas com a substância de ensaio, amostras de solo tratadas com a mesma quantidade de solvente(s) (sem adição da substância em ensaio). Estas amostras são utilizadas para medições de biomassa no início, durante e no final dos estudos de modo a verificar os efeitos do(s) solvente(s) na biomassa microbiana.

Os balões contendo o solo tratado podem ser ligados ao sistema de fluxo descrito na Figura 1 ou tapados com a coluna de absorção ilustrada na figura 2 (ver apêndice 3).

([1]) O cálculo da concentração inicial com base na área utiliza a seguinte equação:

$$C_{solo}[mg/kg_{solo}] = \frac{A[kg/ha]\cdot 10^{6}[mg/kg]}{1[m]\cdot 10^{4}[m^{2}/ha]\cdot d[kg_{solo}/m^{3}]}$$

C_{solo} = Concentração inicial no solo [$mg\cdot kg^{-1}$]

A = Taxa de aplicação [$kg\cdot ha^{-1}$]; 1 = espessura da camada de solo no campo [m]; d = densidade aparente do solo seco [$kg\cdot m^{-3}$].

Em geral, uma taxa de aplicação de 1 kg ha^{-1} resulta numa concentração no solo de aproximadamente 1 $mg\cdot kg^{-1}$, numa camada de 10 cm (assumindo uma densidade aparente de 1 $g\cdot cm^{-3}$).

▼B

1.9.3 **Amostragem e medição**

A intervalos de tempo apropriados, removem-se dois balões de incubação, extraem-se as respectivas amostras de solo com solventes apropriados de polaridade diferente e analisa-se a substância de ensaio e/ou os produtos de transformação. Um estudo bem planeado deverá incluir um número de balões suficiente para que possam ser utilizados dois balões em cada ponto de amostragem. A intervalos de tempo variados durante a incubação de cada amostra de solo (intervalos de 7 dias durante o primeiro mês e de 17 dias nos meses subsequentes), e no final do período de incubação, as soluções de absorção ou os materiais sólidos de absorção deverão ser removidos e analisados relativamente à presença de produtos, voláteis. Para além de uma amostra de solo recolhida imediatamente após a aplicação da substância de ensaio (amostra do dia 0), deverão ser incluídos, pelo menos, 5 pontos de amostragem. Os intervalos de tempo deverão ser escolhidos de modo a possibilitar o estabelecimento do padrão de desaparecimento da substância de ensaio e dos padrões de formação e desaparecimento dos produtos de transformação (por exemplo, 0, 1, 3, 7 dias; 2, 3 semanas; 1, 2, 3 meses, etc.).

No caso de se utilizar uma substância de ensaio marcada com ^{14}C, a radioactividade não extractável será quantificada por combustão e será calculado um balanço de massa para cada intervalo de amostragem.

No caso de incubação anaeróbia ou *paddy*, as fases de solo e água podem ser analisadas conjuntamente para a substância de ensaio e produtos de transformação ou ser separadas por filtração ou centrifugação antes da extracção e análise.

1.9.4. **Ensaios opcionais**

A fim de estimar a influência da temperatura e humidade do solo nas taxas de transformação de uma substância de ensaio e/ou dos seus produtos de transformação no solo, poderá ser útil realizar estudos em condições aeróbias, não estéreis, noutras condições de temperatura e humidade.

Pode tentar-se uma caracterização mais aprofundada da radioactividade não extractável utilizando, por exemplo, extracção com fluidos supercríticos.

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

As quantidades de substância de ensaio, produtos de transformação, substâncias voláteis (apenas em percentagem) e produtos não extractáveis, devem ser indicadas na forma de percentagem da concentração aplicada inicialmente e, quando apropriado, em $mg\text{-}kg^{-1}$ de solo (com base em peso de solo seco), para cada intervalo de amostragem. Para cada um destes intervalos deverá ainda apresentar-se um balanço de massa, em percentagem da concentração aplicada inicialmente. A representação gráfica das concentrações da substância de ensaio em função do tempo permitirá estimar a sua semivida de transformação, ou DT_{50}. Os produtos dê transformação principais devem ser identificados e os valores das suas concentrações devem também ser representados graficamente em função do tempo a fim de evidenciar as suas taxas de formação e desaparecimento. Considera-se um produto de transformação principal qualquer produto cuja concentração seja $\geq$ 10 % da dose aplicada em qualquer altura ao longo do estudo.

Os produtos voláteis retidos fornecem alguma indicação sobre a capacidade de volatilização, a partir do solo, de uma substância de ensaio e dos seus produtos de transformação.

▼B

Devem ser determinados valores mais precisos para as semividas ou DT_{50} e se apropriado, para DT_{75} e DT_{90}, através da aplicação de modelos cinéticos apropriados. Os valores de semivida e de DT50 devem ser apresentados conjuntamente com a descrição do modelo utilizado, da ordem da cinética da reacção e do coeficiente de determinação (r^2). É preferível assumir uma cinética de primeira ordem, excepto se $r^2 < 0{,}7$. Quando apropriado, os cálculos devem ser igualmente aplicados aos produtos de transformação principais. As referências 31 a 35 descrevem exemplos de modelos apropriados.

No caso de estudos de taxas conduzidos a várias temperaturas, as taxas de transformação devem ser descritas em função da temperatura, dentro da gama de temperaturas utilizada experimentalmente, através duma relação de Arrhenius do tipo:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } \ln k = 1nA - \frac{B}{T},$$

em que ln A e B correspondem, respectivamente, aos parâmetros de regressão ordenada na origem e declive da melhor correlação linear obtida entre ln k e 1/T, k representa a constante de velocidade à temperatura T e T representa a temperatura em kelvin. Deve ter-se em atenção que a relação de Arrhenius é válida para um intervalo limitado de temperatura, no caso de a transformação ser influenciada pela acção microbiana.

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Apesar de os estudos serem efectuados num sistema laboratorial artificial, os resultados permitirão obter uma estimativa da taxa de transformação da substância de ensaio, assim como da taxa de formação e desaparecimento dos produtos de transformação em condições de campo (36) (37).

O estudo da via de transformação de uma substância de ensaio fornece informação sobre o modo como a substância aplicada é estruturalmente modificada no solo por reacções químicas e microbianas.

3. **RELATÓRIO**

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir o seguinte:

Substância de ensaio:

— nome vulgar, nome químico, número CAS, fórmula estrutural (com indicação da(s) posição(s) de marcação no caso da utilização de material marcado radioactivamente) e propriedades fisico-químicas relevantes (ver secção 1.5),

— pureza (impurezas) da substância de ensaio,

— pureza radioquímica do produto químico marcado e actividade específica (quando apropriado).

Substâncias de referência:

— nome químico e estrutura das substâncias de referência utilizadas para a caracterização e/ou identificação dos produtos de transformação.

Solos utilizados no ensaio:

— características do local de recolha,

— data e procedimento utilizado para a recolha de amostras do solo,

▼B

— propriedades dos solos, tais como, pH, teor de carbono orgânico, textura (% de areia, % de silte, % de argila), capacidade de troca catiónica, densidade aparente, características de retenção de água e biomassa microbiana,

— duração e condições de armazenamento do solo (caso tenha sido armazenado).

Condições do ensaio:

— datas em que os estudos foram efectuados,

— quantidade de substância de ensaio aplicada,

— solventes utilizados e método de aplicação da substância de ensaio,

— peso do solo inicialmente tratado e retirado para análise em cada intervalo de tempo,

— descrição do sistema de incubação utilizado,

— taxas de fluxo de ar (apenas para sistemas de fluxo),

— temperatura do sistema experimental,

— teor de humidade do solo durante a incubação,

— biomassa microbiana no início, durante e no final dos estudos aeróbios,

— pH, concentração de oxigénio e potencial redox no início, durante e no final dos estudos anaeróbios e *paddy*,

— método(s) de extracção,

— métodos de quantificação e identificação da substância de ensaio e principais produtos de transformação no solo e materiais de absorção,

— número de repetições (duplicados) e número de controlos.

Resultados:

— resultado da determinação da actividade microbiana,

— repetitividade e sensibilidade dos métodos analíticos utilizados,

— taxas de recuperação (na secção 1.7.1 indicam-se os valores percentuais que deverão verificar-se para um estudo válido),

— tabelas de resultados expressos como percentagens da dose inicial aplicada e, quando apropriado, como mg-kg^{-1} de solo (com base no peso seco),

— balanço de massa durante e no final dos estudos,

— caracterização da radioactividade não extractável (ligada) ou de resíduos presentes no solo,

— quantificação do CO_2 e outros compostos voláteis libertados,

— gráficos representativos da concentração de substância de ensaio no solo e, quando apropriado, dos produtos de transformação principais, em função do tempo,

— valores de semivida ou DT_{50}, DT_{75} e DT_{90} para a substância de ensaio e, quando apropriado, para os produtos de transformação principais, incluindo os limites de confiança,

▼B

— estimativa da taxa de degradação abiótica em condições estéreis,

— uma avaliação da cinética de transformação da substância de ensaio e, quando apropriado, dos produtos de transformação principais,

— vias de transformação propostas, quando apropriado,

— discussão e interpretação dos resultados,

— dados experimentais (ou seja, exemplos de cromatogramas, exemplos de cálculos de taxas de transformação e métodos utilizados para identificar os produtos de transformação).

4. **REFERÊNCIAS**

(1) US Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) Directiva 95/36/CE de 14 de Julho de 1995 que altera a Directiva 91/414/CEE relativa à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. Parte A do Anexo II e Parte A do Anexo III: Destino e comportamento no ambiente.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality-Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF — Japan 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OCDE (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Itália, 18-20 de Janeiro de 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley- VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adoptado a 12 de Maio de 1981).

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Apêndice V à Directiva 67/548/CEE.

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2.ª edição.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2.ª edição.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. Primeira Edição.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt am Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M, Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principies of pesticide degradation in soil. In «Environmental Dynamics of Pesticides». R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

▼B

Apêndice 1

TENSÃO DE ÁGUA, CAPACIDADE DE CAMPO (FC) E CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA (WHC) ([1])

Altura da Coluna de Água [cm]	pF ([a])	bar ([b])	Observações
10^7	7	10^4	Solo seco
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Ponto de emurchecimento
10^4	4	10	
10^3 .	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 ([c])	Gama de Capacidade de campo ([d])
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (aproximação)
1	0	0,001	Solo saturado de água

([a]) pF = log da altura da coluna de água, em centímetros.
([b]) 1 bar = 10^5Pa.
([c]) Corresponde a um teor de água aproximado de 10 % na areia, 35 % no limo e 45 % na argila.
([d]) A capacidade de campo não é constante, variando com o tipo de solo, com valores de pF entre 1,5 e 2,5.

A tensão de água é medida em centímetros da coluna de água ou em bar. Devido à extensa gama de valores para a tensão de sucção, esta é simplesmente expressa como o valor de pF que é equivalente ao logaritmo da altura da coluna de água, em centímetros.

A capacidade de campo é definida como a quantidade de água que pode ser armazenada, contra a gravidade, por um solo natural, 2 dias após um extenso período de precipitação ou após irrigação suficiente. É determinado no solo não perturbado, *in situ,* no campo. Esta medição não é, portanto, aplicável a amostras de solo processadas laboratorialmente. Os valores de FC determinados em solos processados podem apresentar amplas variâncias sistemáticas.

A capacidade de retenção de água (WHC) é determinada laboratorialmente em solos não perturbados ou em solos processados, através da saturação de uma coluna de solo com água por transporte capilar. É particularmente útil para solos processados e pode atingir valores até 30 % superiores à capacidade de campo (1). Para além disso, é mais fácil a sua determinação experimental do que a determinação de valores fiáveis de FC.

Notas

([1]) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt am Main.

▼B

Apêndice 2

TEORES DE HUMIDADE DO SOLO (g de água por 100 g de solo seco) DE VÁRIOS TIPOS DE SOLOS PROVENIENTES DE DIFERENTES PAÍSES

Tipo de solo	País	Teor de humidade do solo a		
		WHC (1)	pF = 1,8	pF = 2,5
Arenoso	Alemanha	28,7	8,8	3,9
Limo-arenoso	Alemanha	50,4	17,9	12,1
Limo-arenoso	Suíça	44,0	35,3	9,2
Franco-limoso	Suíça	72,8	56,6	28,4
Argilo-limoso	Brasil	69,7	38,4	27,3
Argilo-limoso	Japão	74,4	57,8	31,4
Areno-limoso	Japão	82,4	59,2	36,0
Franco-limoso	EUA	47,2	33,2	18,8
Areno-limoso	EUA	40,4	25,2	13,3

(1) Capacidade de Retenção de Agua

▼B

Apêndice 3

Figura 1:

Exemplo de um sistema de fluxo para o estudo da transformação de produtos químicos no solo ([1]) ([2])

1: válvula de agulha

2: frasco de lavagem de gás, contendo água

3: membrana de ultrafiltração (apenas para condições estéreis), porosidade. 0,2 µm

4: balão de metabolismo do solo (coberto de água apenas para condições anaeróbias e paddy)

5: frasco com etilenoglicol para retenção de compostos orgânicos voláteis

6: frasco com ácido sulfúrico para retenção de compostos voláteis alcalinos

7, 8: frasco com hidróxido de sódio para retenção de CO_2 e outros compostos voláteis acídicos.

9: medidor de fluxo.

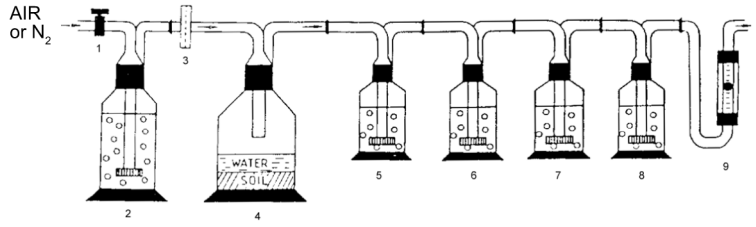
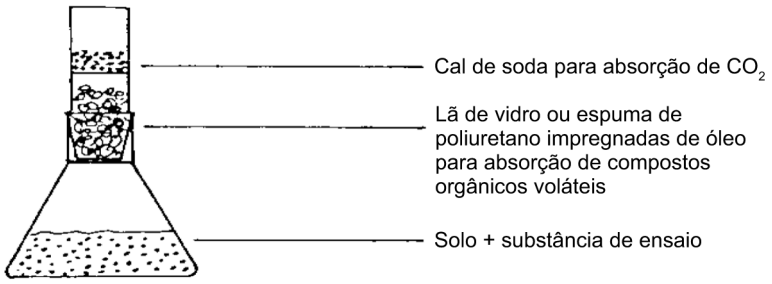


Figura 2

Exemplo de um balão biométrico para o estudo da transformação de produtos químicos no solo ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

C.24. TRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS E ANAERÓBIAS EM SISTEMAS DE SEDIMENTOS AQUÁTICOS

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 308 (2002).

1.1. INTRODUÇÃO

Os produtos químicos podem penetrar em águas superficiais ou profundas por diversas vias, tais como aplicação directa, arrastamento, escoamento superficial, drenagem, eliminação de resíduos, efluentes industriais, domésticos ou agrícolas e deposição atmosférica. O presente Método de Ensaio descreve um método laboratorial para avaliar as transformações aeróbias e anaeróbias de produtos químicos orgânicos em sistemas de sedimentos aquáticos e baseia-se em normas de ensaio anteriormente definidas (1) (2) (3) (4) (5) (6). O número e tipo de sedimentos que devem ser utilizados no presente ensaio foi acordado numa reunião de trabalho da OCDE sobre selecção de solos e sedimentos, que decorreu em Belgirate, Itália, em 1995 (7). Foram ainda feitas recomendações relativas à recolha, manipulação e armazenamento das amostra de sedimentos, tendo como base a Orientação ISO (8). Os estudos aqui descritos são necessários para os compostos químicos utilizados na água ou que são susceptíveis de vir a atingir o ambiente aquático pelas vias supracitadas.

As condições nos sistemas de sedimentos aquáticos naturais são frequentemente aeróbias na fase aquática superior. Enquanto a camada superficial de sedimentos pode ser aeróbia ou anaeróbia, a camada mais profunda é usualmente anaeróbia. De modo a abranger as diferentes condições, o presente documento descreve tanto ensaios aeróbios como anaeróbios. O ensaio aeróbio simula uma coluna de água aeróbia no topo de uma camada aeróbia de sedimentos que é sustentada por um gradiente anaeróbio. O ensaio anaeróbio simula um sistema água-sedimento completamente anaeróbio. Em algumas circunstâncias poderá ser necessário utilizar condições significativamente diferentes das descritas nas presentes recomendações, por exemplo, utilizando núcleos intactos de sedimento ou sedimentos que possam ter sido expostos à substância de ensaio; nestes casos, deverão ser utilizados outros métodos disponíveis (9).

1.2. DEFINIÇÕES

Devem ser sempre utilizadas unidades do Sistema Internacional (SI).

Substância de ensaio: Qualquer substância, quer seja o composto inicial ou um produto de transformação relevante.

Produtos de transformação: Todas as substâncias resultantes de reacções de transformação bióticas ou abióticas da substância de ensaio, incluindo CO_2 e resíduos ligados.

Resíduos ligados:«resíduos ligados» representam compostos presentes no solo, planta ou animal, que, após extracção, persistem na matriz quer na forma da substância inicial quer como um dos seus metabolito(s). O método de extracção não poderá alterar substancialmente nem os próprios compostos nem a estrutura da matriz. A natureza da ligação poderá ser parcialmente determinada utilizando métodos extractivos que alterem a matriz e através de técnicas analíticas sofisticadas. Têm sido identificadas deste modo, por exemplo, ligações do tipo covalente, iónico e de absorção/adsorção, assim como encapsulação. De um modo geral, a formação de resíduos ligados reduz significativamente a bioacessibilidade e a biodisponibilidade das substâncias (10) [adaptado de IUPAC 1984 (11)].

▼B

Transformação aeróbia (oxidante): Reacções que ocorrem na presença de oxigénio molecular (12).

Transformação anaeróbia (redutora): Reacções que ocorrem na ausência de oxigénio molecular (12).

Águas naturais: São águas superficiais provenientes de charcos, rios, cursos de água, etc.

Sedimento: É uma mistura de constituintes químicos minerais e orgânicos, em que os últimos incluem compostos com elevado conteúdo de carbono e azoto e de peso molecular elevado. É depositado por águas naturais, com as quais forma uma interface.

Mineralização: Degradação completa de um composto orgânico em CO_2 e H_2O, em condições aeróbias, ou em CH_4, CO_2 e H_2O, em condições anaeróbias. No contexto do presente método de ensaio, quando se utiliza um composto marcado radioactivamente, o termo mineralização refere-se à sua degradação extensa, envolvendo a oxidação ou redução de um átomo de carbono marcado e a libertação da quantidade correspondente de $^{14}CO_2$ ou $^{14}CH_4$, respectivamente.

Semivida: $t_{0,5}$, é o tempo necessário para a transformação de 50 % da substância de ensaio, nos casos em que a transformação pode ser descrita por uma cinética de primeira ordem. A semivida da substância é independente da sua concentração inicial.

DT_{50} (Tempo de Desaparecimento 50): Tempo necessário para reduzir a concentração inicial da substância de ensaio em 50 %.

DT_{75} (Tempo de Desaparecimento 75): Tempo necessário para reduzir a concentração inicial da substância de ensaio em 75 %.

DT_{90} (Tempo de Desaparecimento 90): Tempo necessário para reduzir a concentração inicial da substância de ensaio em 90 %.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

A identificação e quantificação dos produtos de transformação através de métodos espectroscópicos e cromatográficos deverão envolver a utilização de substâncias de referência.

1.4. INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA DE ENSAIO

Embora possam ser utilizadas para a medição da taxa de transformação substâncias de ensaio marcadas isotopicamente ou não marcadas, é de preferir a utilização de material marcado. Para o estudo da via de transformação e para o estabelecimento do balanço de massa, é obrigatória a utilização de compostos marcados. A marcação recomendada é com ^{14}C, embora a utilização de outros isótopos, tais como ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H e ^{32}P, possa igualmente revelar-se útil. A marcação deve ser feita, tanto quanto possível, na(s) zona(s) mais estável(eis) da molécula ([1]). A pureza química e/ou radioquímica da substância de ensaio deve ser de, pelo menos, 95 %.

Antes de se efectuar um ensaio, deve estar disponível a seguinte informação sobre a substância de ensaio:

(a) solubilidade em água (Método A.6);

(b) solubilidade em solventes orgânicos;

(c) pressão de vapor (Método A.4) e constante da Lei de Henry;

([1]) Por exemplo, se a estrutura da substância de ensaio inclui um anel, este deverá ser marcado; no caso de a substância de ensaio possuir dois ou mais anéis, poderá ser necessário efectuar estudos independentes de modo a avaliar o destino de cada um dos anéis marcados e obter informação adequada sobre a formação dos produtos de transformação.

▼B

(d) coeficiente de partição n-octanol/água (Método A.8);

(e) coeficiente de adsorção (K_d, K_f ou K_{oc}, quando apropriado) (Método C.18);

(f) hidrólise (Método C.7);

(g) constante de dissociação (pK_a) [Norma de Ensaio OCDE 112] (13);

(h) estrutura química da substância de ensaio e, quando aplicável, posição da(s) marcação(ões) isotópica(s).

Nota: A temperatura a que se efectuaram estas medições deverá ser indicada no relatório.

Outras informações poderão ser úteis, como, por exemplo, a existência de dados relativos à toxicidade da substância de ensaio para os microorganismos, dados sobre a biodegradabilidade «fácil» e/ou inerente e dados sobre as transformações aeróbias e anaeróbias no solo.

Deverão estar disponíveis métodos analíticos (incluindo métodos de extracção e erradicação) que permitam a identificação e quantificação da substância de ensaio e dos seus produtos de transformação em água e em sedimentos (ver secção 1.7.2).

1.5. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O método descrito no presente ensaio utiliza um sistema aeróbio e um sistema anaeróbio de sedimento aquático (ver apêndice 1) que permite:

(i) a medição da taxa de transformação da substância de ensaio num sistema água-sedimento;

(ii) a medição da taxa de transformação da substância de ensaio no sedimento;

(iii) a medição da taxa de mineralização da substância de ensaio e/ou dos seus produtos de transformação (caso se utilize a substância de ensaio marcada com C);

(iv) a identificação e quantificação dos produtos de transformação nas fases aquosa e de sedimento, incluindo balanço de massa (caso se utilize a substância de ensaio marcada);

(v) a medição da distribuição da substância de ensaio e dos seus produtos de transformação entre as duas fases durante um período de incubação no escuro (a fim de evitar, por exemplo, o desenvolvimento explosivo de algas), a temperatura constante. Nos casos em que os dados o permitam, determinam-se valores para as semividas, DT_{50}, DT_{75} e DT_{90}, não devendo estes valores ser extrapolados para muito além do período experimental (ver secção 1.2).

Tanto para os estudos aeróbios como para os estudos anaeróbios, são necessários pelo menos dois sedimentos e as respectivas águas associadas (7). No entanto, poderão existir situações em que deverão ser utilizados mais do que dois sedimentos aquáticos, como, por exemplo, no caso de um produto químico que possa estar presente em ambientes de água doce e/ou marítimos.

▼B

1.6. APLICABILIDADE DO ENSAIO

O método é geralmente aplicável a todas as substâncias químicas (não marcadas ou marcadas radioactivamente) para as quais se encontre disponível um método analítico suficientemente sensível e preciso. É aplicável a compostos ligeiramente voláteis, não voláteis, solúveis ou pouco solúveis em água. O ensaio não deve ser aplicado a compostos químicos muito voláteis a partir da água (por exemplo, fumigantes, solventes orgânicos) já que estes, nas condições experimentais descritas, não podem ser mantidos na água e/ou sedimento.

O método tem sido aplicado ao estudo das transformações sofridas por produtos químicos em águas doces e sedimentos embora, em princípio, possa ser igualmente aplicado a sistemas de estuários e marítimos. Não é, no entanto, adequado para simular as condições de águas correntes (por exemplo, rios) ou de alto mar.

1.7. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.7.1. **Recuperação**

A extracção e análise de amostras de água e de sedimento, pelo menos em duplicado, imediatamente após a adição da substância de ensaio, fornece uma primeira indicação relativa à repetitividade do método analítico e à uniformidade do procedimento de aplicação da substância de ensaio. Os valores de recuperação em fases mais adiantadas das experiências são obtidos através dos respectivos balanços de massa (caso se utilize material marcado). Os valores de recuperação devem variar entre 90 % e 110 % no caso de produtos químicos marcados (6) e entre 70 % e 110 % no caso de produtos químicos não marcados.

1.7.2. **Repetitividade e sensibilidade do método analítico**

A repetitividade do método analítico (com excepção da eficiência de extracção inicial) na quantificação da substância de ensaio e dos produtos de transformação pode ser verificada pela análise, em duplicado, do mesmo extracto das amostras de água ou de sedimento, após incubação durante um período de tempo suficiente para que ocorra a formação de produtos de transformação.

O limite de detecção (LD) do método analítico, tanto para a substância de ensaio como para os produtos de transformação, deve corresponder, no mínimo, ao menor dos seguintes valores: 0,01 $mg\text{-}kg^{-1}$ de água ou sedimento (como substância de ensaio) ou 1 % da dose inicialmente aplicada ao sistema de ensaio. Deve ser igualmente especificado o limite de quantificação (LQ).

1.7.3. **Precisão dos dados de transformação**

A análise de regressão das concentrações da substância de ensaio em função do tempo fornece informação apropriada sobre a precisão da curva de transformação e permite o cálculo dos limites de confiança para as semividas (no caso de cinética de pseudo primeira ordem) ou os valores de DT_{50} e, se adequado, os valores de DT_{75} e de DT_{90}.

1.8. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.8.1. **Sistema de ensaio e aparelhagem**

O estudo deve ser efectuado em recipientes de vidro (por exemplo, frascos, tubos de centrífuga), excepto se existir informação preliminar (tal como coeficientes de partição n-octanol/água, dados de absorção/adsorção, etc.) indicativa de que a substância de ensaio pode aderir ao vidro, caso em que se deve considerar a utilização de um material alternativo (como Teflon). Quando se sabe que a substância de ensaio adere ao vidro, o problema pode ser contornado através da utilização de um ou mais dos seguintes métodos:

▼B

— determinar a massa da substância de ensaio e dos produtos de transformação que se encontram absorvidos/adsorvidos ao vidro,

— efectuar uma lavagem de todo o material de vidro com solvente no final do ensaio,

— utilizar produtos formulados (ver igualmente secção 1.9.2),

— utilizar uma maior quantidade de co-solvente para a adição da substância de ensaio ao sistema. Caso se utilize um co-solvente, este não deverá provocar solvólise da substância de ensaio.

Nos apêndices 2 e 3 apresentam-se exemplos de montagens experimentais típicas de ensaio, ou seja, sistemas de fluxo e biométricos, respectivamente (14). Na referência 15 são descritos sistemas de incubação alternativos. A concepção das montagens experimentais deve permitir a troca de ar ou azoto e a retenção de produtos voláteis. As dimensões da montagem experimental devem estar de acordo com os requisitos do ensaio (ver secção 1.9.1). A ventilação pode ser obtida quer por ligeiro borbulhar, quer por passagem de ar ou azoto sobre a superfície da água. No último caso, é aconselhável agitar ligeiramente a água, a partir do topo, por forma a garantir uma melhor distribuição do oxigénio e azoto. Não deve ser utilizado ar sem CO_2, pois tal pode provocar um aumento do pH da água. Em qualquer dos casos, a perturbação do sedimento é indesejável e deve ser, tanto quanto possível, evitada. Os produtos químicos ligeiramente voláteis devem ser ensaiados num sistema biométrico com ligeira agitação da superfície da água. Podem igualmente ser utilizados recipientes fechados com um espaço livre contendo ar atmosférico ou azoto e pequenos recipientes internos para a retenção de produtos voláteis (16). Durante o ensaio aeróbio, o gás presente na zona superior livre deve ser mudado regularmente de modo a compensar o consumo de oxigénio pela biomassa.

Para a recolha de produtos de transformação voláteis, podem ser utilizados dispositivos de retenção adequados, embora não se restringindo a uma solução de hidróxido de potássio ou de hidróxido de sódio a 1 $mol.dm^{-3}$ para a retenção de dióxido de carbono ([1]) e etilenoglicol, ou etanolamina ou uma solução de parafina a 2 % em xileno para compostos orgânicos. Os produtos voláteis formados em condições anaeróbias, tais como o metano, podem ser removidos, por exemplo, através de peneiros moleculares. Estes compostos voláteis podem ser sujeitos a combustão, a CO_2, por exemplo, por passagem do gás através de um tubo de quartzo cheio com CuO a uma temperatura de 900 ºC e recuperando o CO_2 formado num absorvente alcalino (17).

É necessária aparelhagem laboratorial adequada à análise química da substância de ensaio e dos produtos de transformação (por exemplo, cromatografia gás-líquido (GLC), cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), cromatografia de camada fina (TLC), espectroscopia de massa (MS), cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC-MS), cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massa (LC-MS), ressonância magnética nuclear (NMR), etc.), incluindo sistemas de detecção para produtos marcados radioactivamente, ou não marcados. No caso de se utilizar material marcado radioactivamente, serão ainda necessários um contador de cintilações e uma mufla de combustão oxidante (para a combustão de amostras de sedimento antes da análise de radioactividade).

Outro equipamento corrente de laboratório necessário inclui o material apropriado para determinações físico-químicas e biológicas (ver tabela 1, secção 1.8.2.2), material de vidro, produtos químicos e reagentes.

([1]) Uma vez que estas soluções alcalinas de absorção absorvem também o dióxido de carbono proveniente do ar de ventilação e da respiração em experiências aeróbias, devem ser trocadas a intervalos regulares, de modo a evitar a sua saturação e consequente perda de capacidade de absorção.

▼B

1.8.2. **Selecção e número de sedimentos aquáticos**

Os locais de amostragem devem ser seleccionados de acordo com os objectivos do ensaio para cada situação. Na sua selecção, deve ter-se em conta o historial de possíveis descargas de origem agrícola, industrial ou doméstica que tenham atingido a água no local de captação ou a montante. Não devem ser utilizados sedimentos que tenham sido contaminados com a substância de ensaio ou seus análogos estruturais nos últimos 4 anos.

1.8.2.1. *Selecção de sedimento*

Para os estudos aeróbios (7), utilizam-se normalmente dois sedimentos que devem diferir em relação ao teor de carbono orgânico e à textura. Um dos sedimentos deve apresentar um elevado teor de carbono orgânico (2,5 - 7,5 %) e uma textura fina, enquanto o outro deve apresentar um baixo teor de carbono orgânico (0,5 - 2,5 %) e uma textura grossa. A diferença mínima entre os teores de carbono orgânico deverá ser de 2 %. Define-se «textura fina» como um conteúdo em [argila + silte] ([1]) > 50 % e «textura grossa» como um conteúdo em [argila + silte] < 50 %. A diferença entre os conteúdos em [argila + silte] nos dois sedimentos deve ser de, pelo menos, 20 %. Nos casos em que o produto químico possa atingir águas marinhas, pelo menos um dos sistemas água-sedimento deve ser de origem marinha.

Para o estudo em condições estritamente anaeróbias, devem ser recolhidas amostras de dois sedimentos (incluindo as respectivas águas) a partir de zonas anaeróbias de massas de água superficiais (7). Tanto a fase sedimentar como a aquosa devem ser cuidadosamente manuseadas e transportadas na ausência de oxigénio.

Para a selecção dos sedimentos a incluir no ensaio podem ser importantes outros parâmetros, que devem ser considerados caso a caso. Por exemplo, a gama de pH dos sedimentos será importante para a análise de produtos químicos cuja transformação e/ou absorção/adsorção possa depender do pH. A dependência da absorção/adsorção relativamente aos valores de pH pode ser indicada pelo pK_a da substância de ensaio.

1.8.2.2. *Caracterização das amostras água-sedimento*

Os parâmetros mais relevantes que deverão ser medidos tanto para a água como para o sedimento e incluídos no relatório (fazendo referência ao método utilizado), assim como a fase do ensaio em que devem ser determinados, encontram-se resumidos na tabela abaixo. As referências (18) (19) (20) (21) descrevem os métodos para determinação desses parâmetros.

Em casos específicos, poderá ser necessário medir, e incluir no relatório, outros parâmetros [por exemplo, para água doce: partículas, alcalinidade, dureza, condutividade, NO_3/PO_4 (razão e valores individuais); para sedimentos: capacidade de troca catiónica, capacidade de retenção de água, carbonato, azoto e fósforo totais; para sistemas marítimos: salinidade]. Para a avaliação das condições redox, especialmente no que diz respeito à transformação anaeróbia, poderá ainda ser útil a análise dos sedimentos e da água relativamente à presença de nitrato, sulfato, ferro biodisponível e outros aceitadores electrónicos possíveis.

([1]) [Argila + silte] é a fracção mineral do sedimento com dimensão de partícula < 50 μm.

▼B

Medição de parâmetros para a caracterização das amostras água-sedimento (7) (22) (23)

Parâmetro	Fase do procedimento de ensaio					
	Amostragem de campo	Manuseamento posterior	Início da aclimatação	Início do ensaio	Durante o ensaio	Final do ensaio
Água						
Origem	X					
Temperatura	X					
PH	X		X	X	X	X
TOC			X	X		X
Concentração de O_2 (*)	X		X	X	X	X
Potencial redox (*)			X	X	X	X
Sedimento						
Origem	X					
Profundidade da camada	X					
PH		X	X	X	X	X
Distribuição do tamanho das partículas		X				
TOC		X	X	X		X
Biomassa microbiana (**)		X		X		X
Potencial redox (*)	Observação (cor/ /cheiro)		X	X	X	X

(*) Investigações recentes revelaram que as medições das concentrações de oxigénio e de potenciais redox na água não possuem valor mecanístico nem preditivo relativamente ao crescimento e desenvolvimento de populações microbianas em águas superficiais (24)(25). A determinação da carência bioquímica de oxigénio (BOD, durante a amostragem de campo, no início e no final do ensaio) e das concentrações dos micro/macronutrientes Ca, Mg e Mn (no início e no final do ensaio), para o caso da água, e a medição do N e P totais no caso de sedimentos (durante a amostragem de campo e no final do ensaio) podem constituir instrumentos mais úteis para a interpretação e avaliação das taxas e vias de biotransformação aeróbia.

(**) Métodos utilizados: Para estudos aeróbios, o método da taxa de respiração microbiana (26); método de fumigação (27) ou contagem de colónias (por exemplo, bactérias, actinomicetes, fungos e colónias totais). Para estudos anaeróbios, taxa de metanogénese.

1.8.3. **Recolha, manuseamento e armazenamento**

1.8.3.1. *Recolha*

Para a amostragem de sedimento, deve ser utilizada a versão preliminar da Orientação ISO para a amostragem de sedimentos (8). As amostras de sedimento recolhidas devem incluir toda a camada superior (5 cm a 10 cm) do sedimento. A água associada deve ser recolhida da mesma zona ou local e ao mesmo tempo que o sedimento. Para o estudo anaeróbio, o sedimento e a água associada devem ser recolhidos e transportados na ausência de oxigénio (28) (ver secção 1.8.2.1). Encontram-se descritos na literatura alguns dispositivos de amostragem (8) (23).

▼B

1.8.3.2. *Manuseamento*

A separação do sedimento da água é feita por filtração e o sedimento húmido é crivado com um peneiro de 2 mm, utilizando um excesso de água recolhida no mesmo local que é posteriormente rejeitada. Em seguida, misturam-se quantidades conhecidas de sedimento e água, na razão desejada (ver secção 1.9.1), em balões de incubação e preparam-se para o período de aclimatação (ver secção 1.8.4). Para o estudo anaeróbio, todos os passos devem ser realizados na ausência de oxigénio (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. *Armazenamento*

A utilização de amostras de sedimento e água recentemente recolhidas é vivamente recomendada. No entanto, caso o seu armazenamento seja necessário, o sedimento e a água devem ser crivados, tal como descrito anteriormente, e armazenados conjuntamente, com o sedimento coberto de água (camada de água de 6 cm a 10 cm), no escuro, a 4 ± 2 ºC ([1]) por um período máximo de 4 semanas (7) (8) (23). As amostras que se destinam a estudos aeróbios devem ser armazenadas em condições de boa ventilação (por exemplo, em recipientes abertos), enquanto as amostras destinadas a estudos anaeróbios devem ser armazenadas na ausência de oxigénio. Durante o transporte e o armazenamento não poderá verificar-se o congelamento do sedimento e da água ou a secagem do sedimento.

1.8.4. **Preparação das amostras de sedimento/água para o ensaio**

Cada amostra de sedimento/água deverá ser sujeita a um período de aclimatação, antes da adição da substância de ensaio. Para tal, cada amostra é colocada no recipiente de incubação que será utilizado no ensaio principal, exactamente nas mesmas condições de incubação do ensaio (ver secção 1.9.1). O período de aclimatação decorrerá durante o tempo necessário para atingir uma estabilidade razoável do sistema, reflectido pelos valores de pH, concentração de oxigénio na água, potencial redox do sedimento e da água e separação macroscópica das fases. O período de aclimatação deverá ser, geralmente, de uma a duas semanas, não devendo exceder quatro semanas. Os resultados das determinações efectuadas durante este período devem ser incluídos no relatório.

1.9. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1.9.1. **Condições do ensaio:**

O ensaio deve ser efectuado num aparelho de incubação (ver secção 1.8.1), com uma razão volume de água/sedimento entre 3:1 e 4:1 e uma espessura da camada de sedimento de 2,5 cm (± 0,5 cm).[2] Recomenda-se ter um mínimo de 50 g de sedimento (peso seco) por recipiente de incubação.

O ensaio deve ser efectuado no escuro, a uma temperatura constante compreendida entre 10 e 30 ºC. Considera-se adequada uma temperatura de (20 ± 2) ºC. Nos casos em que tal for apropriado, dependendo da informação pretendida com o ensaio, poderá considerar-se a utilização de uma temperatura mais baixa (por exemplo, 10 ºC). A temperatura de incubação deverá ser sempre monitorizada e indicada no relatório.

([1]) Estudos recentes demonstraram que o armazenamento a 4 ºC pode conduzir a uma diminuição do teor de carbono orgânico do sedimento que, por sua vez, poderá resultar numa diminuição da actividade microbiana (34).

▼B

1.9.2. **Tratamento e aplicação da substância de ensaio**

O ensaio é realizado com uma única concentração do produto químico ([1]). No caso de produtos químicos de protecção de colheitas aplicados directamente em massas de água, a dosagem máxima indicada no rótulo deve ser considerada como a taxa máxima de aplicação calculada com base na área superficial de água do recipiente de ensaio. Em todos os restantes casos, a concentração a utilizar deverá basear-se em previsões de emissões ambientais. Devem adoptar-se precauções que garantam a aplicação de uma concentração adequada da substância de ensaio, de modo a permitir a caracterização da via de transformação e da formação e desaparecimento dos produtos de transformação. Nos casos em que, no início do estudo, as concentrações da substância de ensaio se encontram próximas dos limites de detecção e/ou nos casos em que os principais produtos de transformação não podem ser facilmente detectados quando a sua concentração é de 10 % da taxa de aplicação da substância de ensaio, poderá ser necessária a aplicação de doses mais elevadas (por exemplo, 10 vezes superiores). No entanto, caso se utilizem no ensaio concentrações superiores, estas não deverão ter efeitos adversos significativos na actividade microbiana do sistema água-sedimento. A fim de obter uma concentração constante da substância de ensaio em recipientes de diferentes dimensões, poderá considerar-se apropriado ajustar a quantidade da substância de ensaio ao volume em ensaio; neste caso, os cálculos deverão basear-se na relação entre a profundidade da coluna de água no recipiente e a profundidade da água no campo (que se assume como sendo de 100 cm, apesar de poderem ser utilizados outros valores). Ver um exemplo de cálculo no apêndice 4.

Idealmente, a substância de ensaio deve ser adicionada à fase aquosa do sistema de ensaio na forma de solução aquosa. No entanto, quando tal for inevitável, poderão utilizar-se pequenas quantidades de solventes miscíveis em água (tais como acetona, etanol) para a aplicação e distribuição da substância de ensaio, desde que a sua concentração não exceda 1 % v/v nem provoque efeitos adversos na actividade microbiana do sistema de ensaio. Durante a preparação da solução aquosa da substância de ensaio devem tomar-se as precauções necessárias e de modo a assegurar a sua completa homogeneidade poderá ser necessário utilizar colunas e pré-mistura. Após a adição da solução aquosa ao sistema de ensaio, a fase aquosa deverá ser suavemente misturada, evitando, tanto quanto possível, perturbar o sedimento.

Embora a utilização rotineira de produtos formulados não seja recomendada, já que os ingredientes da formulação podem afectar a distribuição da substância de ensaio e/ou dos produtos de transformação entre as fases aquosa e sedimentar, no caso de substâncias de ensaio pouco solúveis em água, a sua utilização poderá constituir uma alternativa apropriada.

O número de recipientes de incubação depende do número de pontos de amostragem (ver secção 1.9.3), devendo ser incluídos sistemas de ensaio suficientes para permitir a utilização de dois sistemas em cada ponto de amostragem. Nos casos em que se utilizem unidades de controlo para cada sistema de sedimento aquático, estas não deverão ser tratadas com a substância de ensaio. As unidades de controlo poderão ser utilizadas para a determinação da biomassa microbiana do sedimento e do carbono orgânico total da água e do sedimento no final do estudo. Duas das unidades de controlo (ou seja, uma unidade de controlo de cada sedimento aquático) poderão ser utilizadas para monitorizar os parâmetros requeridos, relativamente ao sedimento e à água, durante o período de aclimatação (ver tabela na secção 1.8.2.2). No caso de a aplicação da substância de ensaio envolver a utilização de um solvente, deverão ser incluídas duas unidades de controlo adicionais para a medição dos potenciais efeitos adversos do solvente na actividade microbiana do sistema de ensaio.

([1]) O ensaio com uma segunda concentração poderá ser útil no caso de produtos químicos que atingem águas superficiais por diferentes vias de entrada, resultando em concentrações significativamente diferentes; nestes casos, é necessário garantir que a concentração mais baixa pode ser analisada com precisão suficiente.

▼B

1.9.3. Normalmente, a duração da experiência não deve exceder 100 dias (6), e deve prosseguir até que se encontrem estabelecidas as vias de degradação e os perfis de distribuição água/sedimento ou até que 90 % da substância de ensaio se tenha dissipado por transformação e/ou volatilização. Deverão ser incluídos, pelo menos, seis pontos de amostragem (incluindo a amostragem no tempo zero). A duração e o regime de amostragem apropriados para o ensaio poderão ser estabelecidos através da realização de um estudo preliminar opcional (ver secção 1.9.4) ou, no caso de existirem, a partir de dados disponíveis sobre a substância de ensaio provenientes de estudos anteriores. No caso de substâncias de ensaio hidrófobas, poderá ser necessária a inclusão de pontos de amostragem adicionais durante o período inicial do estudo, de modo a permitir a determinação da taxa de distribuição entre as fases aquosa e sedimentar.

No tempo correspondente a cada ponto de amostragem, obtêm-se, para análise, recipientes de incubação em duplicado. O sedimento e a fase aquosa sobrenadante são analisados separadamente ([1]). A água superficial deve ser removida cuidadosamente, tendo o cuidado de causar a mínima perturbação possível na fase sedimentar. A extracção e caracterização da substância de ensaio e dos seus produtos de transformação devem ser feitas recorrendo a procedimentos analíticos apropriados. O material que possa ter ficado adsorvido, quer no recipiente de incubação quer nos tubos de ligação aos dispositivos de retenção de substâncias voláteis, deve ser removido.

1.9.4. **Ensaio preliminar opcional**

Nos casos em que a duração e o regime de amostragem não possam ser estimados a partir de outros estudos relevantes sobre a substância de ensaio, pode ser considerado apropriado recorrer a um ensaio preliminar, opcional, que deverá ser efectuado utilizando as mesmas condições experimentais propostas para o estudo definitivo. Caso seja efectuado o ensaio preliminar, as condições experimentais mais relevantes e os resultados devem ser incluídos, de uma forma resumida, no relatório.

1.9.5. **Medições e análise**

A concentração da substância de ensaio e dos seus produtos de transformação na água e no sedimento, em cada ponto de amostragem, deve ser medida e incluída no relatório (expressa em concentração e em percentagem de substância aplicada). De uma forma geral, e a menos que seja apresentada uma justificação razoável para o contrário, devem ser identificados todos os produtos de transformação que sejam detectados em quantidade $\geq$ 10 % da radioactividade aplicada no sistema água-sedimento total, em qualquer ponto de amostragem. Os produtos de transformação cujas concentrações aumentarem continuamente durante o ensaio também devem ser identificados, mesmo nos casos em que a sua concentração não exceda os limites apresentados acima, já que este comportamento poderá ser indicativo de persistência. Esta área deve ser considerada caso a caso e o procedimento adoptado deve ser justificado no relatório.

Os resultados obtidos a partir dos sistemas de retenção de gases/-compostos voláteis (CO_2 e outros compostos químicos, ou seja, compostos orgânicos voláteis) devem ser incluídos no relatório para cada um dos tempos de amostragem. As taxas de mineralização deverão igualmente ser incluídas no relatório, assim como os dados sobre os resíduos não extractáveis (ligados) para cada ponto de amostragem.

([1]) Nos casos em que os produtos de transformação anaeróbia possam ser fácil e rapidamente reoxidados, as condições anaeróbias devem ser mantidas durante a amostragem e a análise.

▼B

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Para cada ponto de amostragem, deverá ser calculado o balanço de massa total ou a recuperação da radioactividade adicionada (ver secção 1.7.1). Os resultados devem ser expressos, no relatório, como percentagem da radioactividade adicionada. A distribuição da radioactividade entre a água e o sedimento deve ser apresentada no relatório, para cada tempo de amostragem, na forma de concentrações e de percentagens.

Devem calcular-se os valores de semivida, DT_{50} e, se apropriado, DT_{75} e DT_{90} da substância de ensaio, e respectivos limites de confiança (ver secção 1.7.3). A informação relativa à taxa de dissipação da substância de ensaio em água e no sedimento poderá ser obtida através da utilização de métodos de avaliação adequados, que podem ir desde a aplicação de um modelo de cinética de pseudoprimeira ordem a técnicas empíricas de ajuste de curvas, que aplicam soluções gráficas ou numéricas, e avaliações mais complexas que utilizem, por exemplo, modelos de compartimento único ou compartimentos múltiplos. Para informação mais pormenorizada poderá consultar-se a literatura relevante (35) (36) (37).

Todos os métodos disponíveis apresentam vantagens e desvantagens e grande variabilidade em termos de complexidade. Se, por um lado, o pressuposto de uma cinética de primeira ordem pode ser uma simplificação excessiva dos processos de degradação e de distribuição, a sua aplicação, quando possível, fornece um termo (constante de velocidade ou semivida) que é facilmente compreendido e bastante útil em modelação por simulação e no cálculo de concentrações ambientais previstas. A aplicação de métodos empíricos ou de modelos de transformação linear pode resultar num melhor ajuste da curva aos dados experimentais e, portanto, permitir uma melhor estimativa dos valores de semivida, DT_{50} e, quando apropriado, DT_{75} e DT_{90}. No entanto, a utilização das constantes assim derivadas é limitada. Por seu lado, a aplicação de modelos de compartimentos permite o cálculo de várias constantes úteis na avaliação de risco, que caracterizam a taxa de degradação nos diferentes compartimentos, bem como a distribuição do produto químico. Estes modelos devem igualmente ser utilizados para estimar as constantes de velocidade para a formação e degradação dos produtos de transformação principais. Em qualquer dos casos, a selecção do método adoptado deve ser justificada no relatório e o experimentador deve demonstrar graficamente e/ou estatisticamente a adequação do ajuste.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório deve incluir a seguinte informação:

Substância de ensaio:

— nome vulgar, nome químico, número CAS, fórmula estrutural (com indicação da posição de marcação no caso da utilização de material marcado radioactivamente) e propriedades físico-químicas relevantes,

— pureza (impurezas) da substância de ensaio,

— pureza radioquímica do produto químico marcado e actividade molar (quando apropriado).

▼B

Substância de referência:

— nome químico e estrutura das substâncias de referência utilizadas para a caracterização e/ou identificação dos produtos de transformação.

Sedimentos e águas utilizados no ensaio:

— localização e descrição do local de recolha das amostras de sedimento aquático, incluindo, se possível, o historial de contaminação,

— toda a informação relacionada com a recolha, armazenamento (caso tenha sido efectuado) e aclimatação dos sistemas água-sedimento,

— características das amostras de água -sedimento, tal como apresentadas na tabela da secção 1.8.2.2.

Condições do ensaio:

— sistema de ensaio utilizado (por exemplo, sistema de fluxo, sistema biométrico, modo de ventilação, método de agitação, volume de água, massa de sedimento, espessura da camada de água e da camada de sedimento, dimensão dos recipientes de ensaio, etc.),

— aplicação da substância de ensaio ao sistema de ensaio: concentração de ensaio utilizada, número de repetições (duplicados) e controlos e modo de aplicação da substância de ensaio (por exemplo, utilização de solvente, caso necessário), etc.,

— temperatura de incubação,

— tempos de amostragem,

— métodos de extracção e respectivas eficiências, assim como métodos analíticos e limites de detecção,

— métodos para caracterização/identificação dos produtos de transformação,

— deviations from the test protocol or test conditions during the study.

Results:

— raw data figures of representative analyses (all raw data have to be stored in the GLP-archive);

— repeatability and sensitivity of the analytical methods used;

— rates of recovery (% values for a valid study are given in section 1.7.1);

— tables of results expressed as % of the applied dose and in $mg \cdot kg^{-1}$ in water, sediment and total system (% only) for the test substance and, if appropriate, for transformation products and non-extractable radioactivity;

— mass balance during and at the end of the studies;

— a graphical representation of the transformation in the water and sediment fractions and in total system (including mineralisation);

— mineralisation rates;

▼B

— half-life, DT_{50} and, if appropriate, DT_{75} and DT_{90} values for the test substance and, where appropriate, for major transformation products including confidence limits in water, sediment and in total system;

— an assessment of the transformation kinetics of the test substance and, where appropriate, the major transformation products;

— a proposed pathway of transformation, where appropriate;

— discussion of results.

4. **REFERENCES**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United--Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop «A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests», 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858--2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597--3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 39, 187-203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 33, 47-60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, pp 1349-1354.

▼B

Annex 1

GUIDANCE ON THE AEROBIC AND THE ANAEROBIC TEST SYSTEMS

Aerobic test system

The aerobic test system described in this test method consists of an aerobic water layer (typical oxygen concentrations range from 7 to 10 $mg \cdot l^{-1}$) and a sediment layer, aerobic at the surface and anaerobic below the surface (typical average redox potentials (E_h) in the anaerobic zone of the sediment range from –80 to –190 mV). Moistened air is passed over the surface of the water in each incubation unit to maintain sufficient oxigen in the head space.

Anaerobic test system

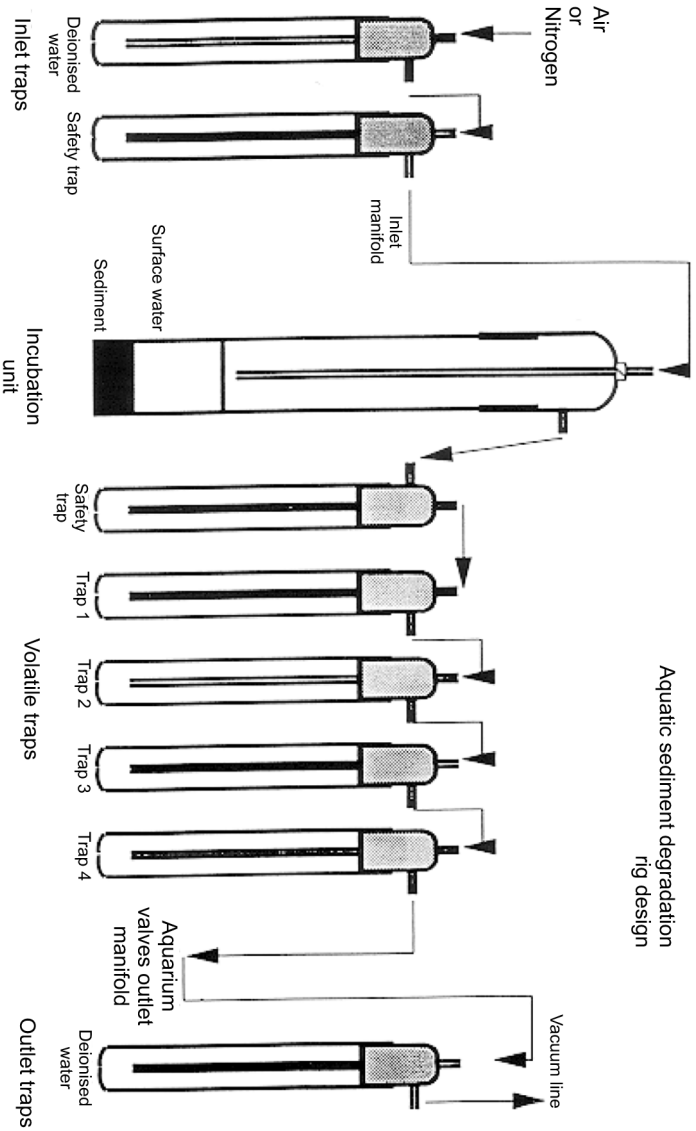
For the anaerobic test system, the test procedure is essentially the same as that outlined for the aerobic system with the exception that moistened nitrogen is passed above the surface of the water in each incubation unit to maintain a head space of nitrogen. The sediment and water are regarded as anaerobic once the redox potential (E_h) is lower than –100 mV.

In the anaerobic test, assessment of mineralisation includes measurement of evolved carbon dioxide and methane.

▼B

Annex 2

EXAMPLE OF A GAS FLOW-THROUGH APPARATUS

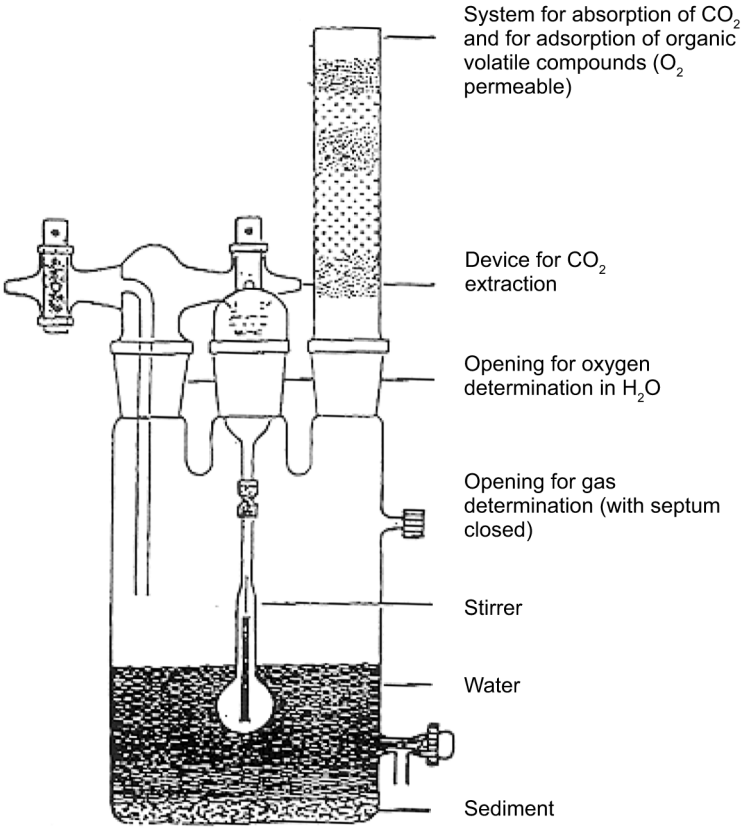


Safety trap, empty
Trap 1:
ethyleneglycol to trap organic volatiles
Trap 2:
sulphuric acid 0.1 M to trap alkaline volatiles
Traps 3 & 4:
sodium hydroxide 2 M to trap CO_2 and other acidic volatiles

▼B

Annex 3

EXAMPLE OF A BIOMETER APPARATUS



▼B

ANNEX 4

EXAMPLE CALCULATION FOR APPLICATION DOSE TO TEST VESSELS

Cylinder internal diameter:	= 8 cm
Water column depth not including sediment:	= 12 cm
Surface area: $3{,}142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Application rate: 500 g test substance/ha corresponds to 5 $\mu g/cm^2$	
Total µg: $5 \times 50{,}3$	= 251,5 µg
Adjust quantity in relation to a depth of 100 cm:	= 30,18 µg
$12 \times 251{,}5 \div 100$	
Volume of water column: $50{,}3 \times 12$	= 603 ml
Concentration in water: $30{,}18 \div 603$	= 0,050 µg/ml or 50 µg/l

▼M1

C.25. MINERALIZAÇÃO AERÓBICA EM ÁGUAS DE SUPERFÍCIE — ENSAIO DE SIMULAÇÃO DE BIODEGRADAÇÃO

1. MÉTODO

Este método é equivalente ao OCDE TG 309 (2004) (1).

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo do presente ensaio é medir a evolução da biodegradação de uma substância em estudo, a baixa concentração, em águas naturais aeróbicas, bem como quantificar as observações efectuadas sob a forma de expressões com taxas cinéticas. O presente ensaio de simulação é realizado em regime descontínuo (*batch*), em grupos de frascos colocados num agitador de laboratório, para determinação das taxas de degradação aeróbica de substâncias orgânicas em amostras de águas de superfície naturais (água doce, água salobra ou água do mar). O ensaio baseia-se na norma ISO/DIS 14592-1 (2), incluindo ainda elementos dos métodos de ensaio C.23 e C.24 (3)(4). A título facultativo, nos ensaios de longa duração, poderá ser utilizado o regime semicontínuo, em vez do regime descontínuo, para evitar a deterioração do organismo de ensaio. O principal objectivo do ensaio de simulação é determinar a mineralização da substância de ensaio nas águas superficiais, sendo essa mineralização utilizada como base para a expressão da cinética de degradação. O ensaio poderá ainda, a título facultativo e como objectivo secundário, ser utilizado para obter informação sobre a degradação primária e sobre a formação dos principais metabolitos. A identificação dos metabolitos e, quando possível, a quantificação das respectivas concentrações, são particularmente importantes para as substâncias que mineralizam de forma muito lenta (p.ex.: com uma meia-vida para o ^{14}C residual total superior a 60 dias). Devido às limitações analíticas, a identificação e quantificação dos principais metabolitos exigirá normalmente a utilização de concentrações elevadas da substância em estudo (p.ex.: > 100 µg/l).

No contexto do presente ensaio, uma baixa concentração significa uma concentração (p.ex.: de menos de 1 µg/l a 100 µg/l) suficientemente baixa para garantir que a cinética de biodegradação obtida pelo ensaio reflecte o que seria de esperar no meio natural. Por comparação com a massa total de substratos de carbono biodegradáveis disponíveis na água natural utilizada para o ensaio, a substância em estudo, presente a baixa concentração, servirá como substrato secundário, pelo que será de esperar uma cinética de biodegradação de primeira ordem (cinética de «não crescimento») com a substância em estudo a ser degradada por «co-metabolismo». Um cinética de primeira ordem implica que a taxa de degradação (mg/l/dia) é proporcional à concentração de substrato, que diminui ao longo do tempo. Numa verdadeira cinética de primeira ordem, a taxa específica constante de degradação, k, é independente do tempo e da concentração, ou seja, k não varia de forma apreciável durante o decurso de uma experiência e não se altera com as concentrações adicionadas entre as diferentes fases da mesma. Por definição, a taxa específica constante de degradação é igual à alteração relativa da concentração por unidade de tempo: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Embora seja de esperar, nas condições descritas, uma cinética de primeira ordem, poderão existir circunstâncias em que outro tipo de cinética seja mais apropriado. Podem observar-se desvios em relação a uma cinética de primeira ordem, por exemplo, no caso em que certos fenómenos de transferência de massa como a taxa de difusão, e não a taxa da reacção biológica, são o factor limitante da biotransformação No entanto, os dados quase sempre podem ser descritos por uma cinética de pseudo primeira ordem, com uma taxa constante dependente da concentração.

▼M1

A informação sobre a biodegradabilidade da substância em estudo a concentrações mais elevadas (p.ex.: a partir de ensaios-padrão de identificação), bem como sobre a degradabilidade abiótica, os metabolitos e as propriedades físico-químicas relevantes, deve estar disponível antes da realização do ensaio, de modo a permitir a planificação da experiência e a interpretação dos resultados. O estudo de substâncias marcadas com ^{14}C e a determinação da distribuição do ^{14}C pelas fases no final do ensaio permitem a determinação da biodegradabilidade global. Quando se utilizam substâncias não marcadas, a biodegradabilidade global só pode ser estimada se se proceder ao ensaio de concentrações mais elevadas e se todos os metabolitos forem conhecidos.

1.2. DEFINIÇÕES

Biodegradação primária: alteração estrutural (transformação) de uma substância química por microorganismos, resultando na perda da identidade química.

Biodegradação funcional: alteração estrutural (transformação) de uma substância química por microorganismos, resultando na perda de uma determinada propriedade.

Biodegradação aeróbica completa: desnaturação de uma substância química por microorganismos, na presença de oxigénio, de que resulta a formação de dióxido de carbono, água e sais minerais dos restantes elementos presente (mineralização) e a produção de biomassa e de produtos orgânicos de biossíntese microbiana.

Mineralização: desnaturação de uma substância química ou de matéria orgânica por microorganismos, na presença de oxigénio, de que resulta a formação de dióxido de carbono, água e sais minerais dos restantes elementos presentes.

Fase de latência: período que decorre desde o início do ensaio até à adaptação do microorganismo responsável pela degradação e ao aparecimento de um grau detectável de biodegradação (p.ex.: 10 % da biodegradação teórica máxima, ou menos, dependendo da precisão da técnica de medição) de uma substância química ou de matéria orgânica.

Nível máximo de biodegradação: nível de biodegradação de uma substância química ou matéria orgânica num ensaio, registado em percentagem, acima do qual não ocorre mais biodegradação durante o ensaio.

Substrato primário: conjunto de fontes naturais de carbono e de energia que permitem o crescimento e a sobrevivência da biomassa microbiana.

Substrato secundário: componente do substrato presente numa concentração tão baixa que a sua degradação apenas fornece aos microorganismos presentes quantidades insignificantes de carbono e de energia, quando comparadas com o carbono e energia fornecidos pela degradação dos componentes principais do substrato (substratos primários).

Taxa constante de degradação: taxa cinética constante de primeira ordem ou de pseudo- primeira ordem, k (d^{-1}), que indica a taxa dos processos de degradação. Numa experiência em modo descontínuo, k é estimado a partir da parte inicial da curva de degradação, após o final da fase de latência.

▼M1

Meia-vida, $t_{1/2}$ (d): termo utilizado para caracterizar a taxa de uma reacção de primeira ordem. É o intervalo de tempo que corresponde a uma divisão da concentração por 2. A meia-vida e a taxa constante de degradação são relacionados pela equação $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Tempo de meia degradação, DT_{50} (d): termo utilizado para quantificar o resultado dos ensaios de biodegradação. É o período, incluindo a fase de latência, necessário para se atingir um valor de 50 % de degradação.

Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ): o limite de detecção (LOD) é a concentração de uma substância abaixo da qual a identidade da mesma não pode ser distinguida da linha de base do aparelho analítico utilizado. O limite de quantificação (LOQ) é a concentração de uma substância abaixo da qual a concentração não pode ser determinada com uma precisão aceitável.

Carbono Orgânico Dissolvido (COD): é a parte do carbono orgânico presente numa amostra de água que não pode ser removida por separação de fases, por exemplo por centrifugação a 40 000 ms^{-2} durante 15 minutos ou por filtração através de membrana com um diâmetro de poro de 0,2 μm-0,45 μm.

Actividade total ^{14}C orgânico (TOA): a actividade total do ^{14}C associado ao carbono orgânico.

Actividade ^{14}C orgânico dissolvido (DOA): a actividade total do ^{14}C associado ao carbono orgânico dissolvido.

Actividade ^{14}C orgânico particulado (POA): a actividade total do ^{14}C associado ao carbono orgânico particulado.

1.3. APLICABILIDADE DO ENSAIO

O ensaio de simulação é aplicável a substâncias orgânicas não voláteis ou pouco voláteis, ensaiadas a baixas concentrações. Utilizando frascos abertos para a atmosfera (p.ex.: tapados com rolha de lã de vidro), as substâncias com uma constante de Henry inferior a cerca de 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (aprox. 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) podem ser consideradas, em termos práticos, como não voláteis. Utilizando frascos fechados, com algum espaço livre na parte superior, é possível ensaiar substâncias ligeiramente voláteis (com uma constante de Henry < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ ou < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) sem perdas a partir do sistema de ensaio. A perda de substâncias marcadas com ^{14}C pode ocorrer, se não se tomarem as devidas precauções, durante a purga do CO_2. Nessas situações, poderá ser necessário capturar o CO_2 num absorvente alcalino interno ou utilizar um sistema externo de absorção do CO_2 (determinação directa do $^{14}CO_2$; ver o anexo 3). Para a determinação da cinética de biodegradação, a concentração da substância em estudo deve ser inferior à sua hidrossolubilidade máxima. Cabe aqui notar, contudo, que os valores de hidrossolubilidade existentes na literatura podem ser consideravelmente mais elevados do que a solubilidade da substância em estudo em águas naturais. A título facultativo, a solubilidade de substâncias em estudo particularmente difíceis de dissolver em água poderá ser determinada utilizando as águas naturais em estudo.

O método pode ser utilizado para simular a biodegradação em águas de superfície livres de partículas grosseiras (ensaio pelágico) ou em águas de superfície turvas, como as que se podem encontrar, por exemplo, junto ao interface água/sedimento (ensaio com sedimento em suspensão).

▼M1

1.4. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O ensaio é realizado em modo descontínuo, incubando a substância em estudo apenas com água de superfície (ensaio pelágico) ou com água de superfície com sólidos/sedimentos em suspensão numa concentração entre 0,01 e 1 g/l de peso seco (ensaio com sedimento em suspensão), para simular uma massa de água com sólidos em suspensão ou com sedimentos re-suspendidos. Uma concentração de sólidos/sedimentos na parte inferior do intervalo referido é típica na maior parte das águas superficiais. Os frascos de ensaio são incubados em ambiente escuro, à temperatura ambiente, em condições aeróbicas e com agitação. Para a determinação da cinética de degradação, devem ser utilizadas pelo menos duas concentrações da substância em estudo, diferentes entre si num factor de 5 a 10 e que devem corresponder à gama de concentrações presentes no ambiente natural. A concentração máxima da substância em estudo não deve ultrapassar os 100 μg/l, mas será preferível utilizar concentrações máximas abaixo dos 10 μg/l, de modo a garantir a biodegradação de acordo com uma cinética de primeira ordem. A concentração mais baixa não deverá exceder os 10 μg/l, mas será preferível utilizar concentrações na gama dos 1-2 μg/l ou mesmo inferiores a 1 μg/l. Normalmente, é possível proceder a uma análise adequada de concentrações dessa ordem de grandeza utilizando substâncias marcadas com ^{14}C disponíveis no comércio. Devido a limitações analíticas, a medição da concentração da substância em estudo com a precisão exigida é muitas vezes impossível, quando a concentração utilizada é ≤ 100 μg/l (ver o segundo parágrafo do ponto 1.7.2). Uma concentração mais elevada da substância em estudo (> 100 μg/l e, por vezes, > 1 mg/l) pode ser utilizada para a identificação e quantificação dos principais metabolitos ou para os casos em que não existe um método analítico específico com um limite de detecção suficientemente baixo. Quando se ensaiarem concentrações elevadas da substância em estudo, poderá não ser possível utilizar os resultados para estimar a constante de degradação de primeira ordem ou a meia-vida, já que a degradação não se fará provavelmente de acordo com uma cinética de primeira ordem.

A degradação será acompanhada a intervalos apropriados, por medição do ^{14}C residual ou da concentração residual da substância em estudo, quando se utilizar um método específico de análise química. A marcação com ^{14}C das partes mais estáveis da molécula em estudo garante a determinação da mineralização total, enquanto que a marcação com ^{14}C das partes menos estáveis da mesma molécula, tal como a utilização de um método de análise específico, só permite avaliar a biodegradação primária. No entanto, a parte mais estável não inclui necessariamente a fracção funcionalmente relevante da molécula (que pode ser relacionada com uma determinada propriedade, como a toxicidade, a bioacumulação, etc). Se for esse o caso, poderá ser melhor utilizar no estudo uma substância marcada com ^{14}C na sua parte funcional, de modo a poder acompanhar a eliminação da propriedade que lhe esteja associada.

1.5. INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

No presente ensaio, a substância em estudo utilizada tanto pode ser marcada como não marcada. A marcação, para a qual se recomenda a técnica do ^{14}C, deve ser normalmente aplicada na(s) parte(s) mais estável(is) da molécula (ver também o ponto 1.4). No caso das substâncias com mais do que um anel aromático, deverão ser marcados, de preferência, um ou mais átomos de carbono em cada anel. Por outro lado, deverão igualmente ser marcados, de preferência com ^{14}C, um ou mais átomos de carbono em ambos os lados das ligações mais facilmente degradáveis. A pureza química e/ou radioquímica da substância em estudo deve ser > 95 %. No caso das substâncias marcadas com radioisótopos, será preferível uma actividade específica da ordem dos μCi/mg (1,85 MBq) ou mais, de modo a facilitar as medições do ^{14}C nos ensaios com baixas concentrações iniciais. Deve ser fornecida a seguinte informação em relação à substância em estudo:

▼M1

— hidrossolubilidade [método de ensaio A.6],

— solubilidade em solvente(s) orgânico(s) (substâncias aplicadas com um solvente ou de baixa hidrossolubilidade),

— constante de dissociação (pKa), nos casos em que a substância seja propensa a protonização ou desprotonização [OCED TG 112] (5),

— pressão de vapor [método de ensaio A.4] e/ou constante de Henry,

— estabilidade química na água e em ambiente escuro (hidrólise) [método C.7].

Quando se proceder ao ensaio de substâncias com baixa hidrossolubilidade em água do mar, poderá também ser útil conhecer a constante de salinização (ou «constante de Setschenow»), K^s, que é definida pela seguinte equação: $\log (S/S') = K^s C_m$, onde S e S' representam a solubilidade da substância em água doce e salgada, respectivamente, e C_m é a concentração molar de sal.

Se o ensaio for conduzido como um «ensaio com sedimento em suspensão», deverá igualmente ser fornecida a seguinte informação:

— coeficiente de partição n-octanol/água [método de ensaio A.8],

— coeficiente de adsorção [método C.18].

Outra informação que poderá ser útil inclui:

— a concentração no ambiente natural, quando for conhecida ou puder ser estimada,

— a toxicidade da substância em estudo para o microorganismo [método C.11],

— a biodegradabilidade imediata e/ou inerente [métodos C.4 A-F, C.12, C.9, OCDE TG 302] (5),

— a biodegradabilidade aeróbica ou anaeróbica em estudos de transformação no solo ou em sedimentos/água [métodos C.23 e C.24].

1.6. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Uma substância, que normalmente deverá ser facilmente degradada em condições aeróbicas (p.ex.: anilina ou benzoato de sódio), deverá ser utilizada como substância de referência. O tempo previsto para a degradação da anilina ou do benzoato de sódio é normalmente inferior a 2 semanas. A substância de referência é utilizada para garantir que a actividade microbiana da água em estudo se encontra dentro de certos limites; ou seja, que a água contém uma população microbiana activa.

▼M1

1.7. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.7.1. **Recuperação**

Imediatamente após a adição da substância em estudo, as concentrações iniciais de ensaio devem ser verificadas por medição da actividade do ^{14}C ou por análise química, no caso das substâncias não marcadas, em amostras pelo menos duplicadas. Essa verificação permitirá obter informação sobre a aplicabilidade e reproductividade do método analítico e ainda sobre a homogeneidade da distribuição da substância em estudo. Normalmente, o valor a utilizar posteriormente na análise dos dados será o valor inicial medido da actividade do ^{14}C ou da concentração da substância em estudo, e não a concentração nominal, o que permite eliminar os eventuais erros devido às perdas por adsorção e a erros de doseamento. No caso de uma substância marcada com ^{14}C, o nível de recuperação no final da experiência é dado pelo balanço de massas (ver o último parágrafo do ponto 1.8.9.4). Em termos ideais, o balanço de massas das substâncias marcadas com ^{14}C deve situar-se entre 90 % e 110 %, enquanto que a precisão analítica deverá resultar numa recuperação inicial de entre 70 % e 110 % para as substâncias em estudo não marcadas. Estes intervalos devem ser interpretados como um objectivo, não devendo ser utilizados como critério de aceitação do ensaio. A título facultativo, poderá ser determinada a precisão analítica para concentrações inferiores da substância em estudo e para os principais metabolitos.

1.7.2. **Reproductividade e sensibilidade do método analítico**

A reproductividade do método analítico (incluindo a eficiência da extracção inicial) em termos da quantificação da substância em estudo e, se aplicável, dos respectivos metabolitos, deverá ser verificada através de cinco análises replicadas de extractos da água de superfície.

O limite de detecção (LOD) do método analítico para a substância em estudo e para os seus metabolitos deverá ser, quando possível, pelo menos 1 % da quantidade inicial aplicada no sistema de ensaio. O limite de quantificação (LOQ) deverá ser igual ou menor do que 10 % da concentração aplicada. A análise química de muitas substância orgânicas e dos respectivos metabolitos exige frequentemente que a substância em estudo seja aplicada numa concentração relativamente elevada, ou seja, > 100 μg/l.

1.8. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.8.1. **Equipamento**

O ensaio pode ser conduzido em frascos cónicos ou cilíndricos de capacidade apropriada (p.ex.: 0,5 l ou 1 l) tapados com rolhas de silicone ou de borracha, ou ainda em frascos de soro com tampas impermeáveis ao CO_2 (p.ex.: rolha de borracha butílica). Outra possibilidade será efectuar o ensaio utilizando diversos frascos para cada concentração e recolhendo, para cada amostra, um frasco inteiro, pelo menos em duplicado (ver o último parágrafo do ponto 1.8.9.1). No caso das substâncias não voláteis e não marcadas com um radioisótopo, não será necessário utilizar rolhas ou tampas impermeáveis aos gases, bastando utilizar rolhas de algodão que evitem a contaminação aérea (ver o segundo parágrafo do ponto 1.8.9.1). As substâncias ligeiramente voláteis devem ser ensaiadas num sistema de tipo biométrico, com ligeira agitação das águas de superfície em estudo. A fim de garantir a ausência de contaminação bacteriana, os frascos poderão, a título facultativo, ser esterilizados por aquecimento ou em autoclave, antes do início do ensaio. Será utilizado o seguinte equipamento de laboratório:

— mesa com agitação ou agitadores magnéticos, para agitação contínua dos frascos de ensaio,

▼M1

— centrifugadora,

— medidor de pH,

— turbidímetro para medições nefelométricas da turbidez,

— forno ou micro-ondas, para as determinações do peso seco,

— aparelho de filtração por membrana,

— autoclave ou forno para a esterilização por calor do material de vidro,

— instalações para o manuseamento de substâncias marcadas com ^{14}C,

— equipamento para quantificar a actividade do ^{14}C em amostras das soluções com o CO_2 precipitado e, se necessário, de amostras de sedimento,

— equipamento analítico para o doseamento da substância em estudo (e da substância de referência) através de análise química específica (p.ex.: cromatografia de gás, HPLC).

1.8.2. **Soluções de reserva da substância em estudo**

Utilizando água desionizada, preparam-se soluções de reserva da substância em estudo e da substância de referência (ver o primeiro parágrafo do ponto 1.8.7). A água desionizada deve estar isenta de qualquer substância que possa ser tóxica para os microorganismos e não deverá ter um teor de carbono orgânico dissolvido (COD) superior a 1 mg/l (6).

1.8.3. **Recolha e transporte da água de superfície**

O local de amostragem para a recolha da água de superfície deve ser seleccionado, independentemente da situação, de acordo com o objectivo do ensaio. Para a escolha dos locais de amostragem, deverão ser tomados em conta os eventuais efeitos da agricultura, da indústria ou das actividades domésticas. Se um determinado ambiente aquático tiver comprovadamente sido contaminado com a substância em estudo ou com outras substâncias estruturalmente análogas durante os quatro anos anteriores, não deverá ser utilizado para a recolha de amostras de água, a não ser que o investigador esteja expressamente interessado na investigação das taxas de degradação em locais previamente expostos à substância. O pH e a temperatura da água devem ser medidos no local de colheita. Devem igualmente ser registadas a profundidade a que foi feita a amostra e a aparência (p.ex.: cor e turbidez) da mesma (ver o ponto 3). A concentração de oxigénio e/ou o potencial redox da água e da camada superficial do sedimento devem ser medidos de modo a demonstrar a existência de condições aeróbicas, a não ser que essas condições sejam óbvias a julgar pela aparência e pela experiência já adquirida no local. A água de superfície deve ser transportada num recipiente cuidadosamente lavado. Durante o transporte, a temperatura da amostra não deve ultrapassar significativamente a temperatura que irá ser utilizada no ensaio. Quando a duração do transporte ultrapassar as 2 a 3 horas, recomenda-se o arrefecimento a 4º C. A amostra de água não deve ser congelada.

▼M1

1.8.4. **Armazenamento e preparação da água de superfície**

O ensaio deve, de preferência, ser iniciado no prazo de um dia a partir da colheita da amostra. O armazenamento da água, quando necessário, deve ser reduzido ao mínimo possível e não deve, em qualquer caso, ultrapassar um máximo de 4 semanas. A amostra de água deve ser conservada a 4 °C, com arejamento, até ser utilizada. Antes disso, devem remover-se as partículas mais grosseiras, por exemplo por filtração através de um filtro de *nylon* com um poro de cerca de 100 μm, de papel de filtro grosso ou ainda por sedimentação.

1.8.5. **Preparação da água corrigida com o sedimento (facultativo)**

Para os ensaios com sedimento em suspensão, o sedimento superficial é acrescentado a frascos contendo água natural (filtrada para remoção das partículas mais grosseiras, como se descreve no ponto 1.8.4), de modo a obter uma suspensão; a concentração de sólidos em suspensão deve ser de 0,01 a 1 g/l. O sedimento superficial deve ser proveniente do mesmo local de onde foi recolhida a amostra de água. Dependendo do tipo de ambiente aquático em causa, o sedimento superficial poderá ser caracterizado por um teor elevado de carbono orgânico (2,5-7,6 %) e por uma textura fina ou por um baixo teor de carbono orgânico (0,5-2,5 %) e por uma textura mais grosseira (3). O sedimento superficial pode ser preparado do seguinte modo: extrair diversas amostras em profundidade do sedimento, utilizando um tubo de plástico transparente, separando as camadas superiores aeróbicas (desde a superfície até uma profundidade máxima de 5 cm) imediatamente após a amostragem e juntando-as numa só amostra. Essa amostra do sedimento deve ser transportada num recipiente com muito espaço livre, de modo a que o sedimento se mantenha em condições aeróbicas (arrefecer a 4 °C se o transporte durar mais do que 2-3 horas). A amostra de sedimento deverá ser suspensa na água de ensaio numa razão de 1:10 e mantida a 4 °C, com arejamento, até ao momento da utilização. O armazenamento do sedimento, quando necessário, deve ser reduzido ao mínimo possível e não deve, em qualquer caso, ultrapassar um máximo de 4 semanas.

1.8.6. **Procedimento semicontínuo (facultativo)**

Nos casos em que a fase de latência, até que seja possível medir uma degradação significativa da substância em estudo, seja longa poderá ser necessária uma incubação prolongada (diversos meses). Se essa característica já for conhecida de anteriores ensaios da substância, o ensaio poderá ser iniciado utilizando um procedimento semicontínuo, que permite a renovação periódica de parte da água ou da suspensão em estudo (ver o anexo 2). Se não for esse o caso, o ensaio normal, em modo descontínuo, poderá ser transformado num ensaio semicontínuo se não se observar nenhuma degradação da substância em estudo durante aproximadamente 60 dias de ensaio em descontínuo (ver o segundo parágrafo do ponto 1.8.8.3).

1.8.7. **Adição da substância em estudo (ou de referência)**

Para as substâncias altamente hidrossolúveis (> 1 mg/l) e pouco voláteis (constante de Henry < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ ou < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$), poderá preparar-se uma solução de reserva em água ionizada (ver o ponto 1.8.2); essa solução deverá ser adicionada aos frascos de ensaio no volume necessário para obter a concentração pretendida. O volume de qualquer solução de reserva adicionada deverá ser limitado ao mínimo que seja prático (sempre que possível, < 10 % do volume final de líquido). Outro procedimento passa pela dissolução da substância em estudo num volume maior de água de ensaio, que poderá ser utilizada em alternativa à utilização de solventes orgânicos.

▼M1

Quando não for possível evitá-lo, as soluções de reserva de substâncias não voláteis e de fraca hidrossolubilidade podem ser preparadas com um solvente orgânico volátil, mas a quantidade adicionada desse solvente não deve exceder 1 % v/v e não deve ter qualquer efeito adverso sobre a actividade microbiana. O solvente não deverá afectar a estabilidade da substância em estudo em meio aquático. O solvente deverá ser escorrido até que só reste uma quantidade extremamente pequena, de maneira a não aumentar significativamente o COD da água ou da suspensão em estudo, factor que deverá ser verificado por análise específica da substância em causa ou, se possível, por análise do COD (6). Deve tomar-se o cuidado de limitar a quantidade de solvente transferido ao mínimo estritamente necessário, bem como de garantir que a quantidade pretendida da substância em estudo possa ser dissolvida no volume final de água previsto para o ensaio. Poderão ser utilizadas outras técnicas para a introdução da substância em estudo nos frascos de ensaio, como se descreve em (7) e (8). Quando se utilizar um solvente orgânico para a aplicação da substância em estudo, frascos de controlo do solvente com a água de ensaio (sem mais nenhuma substância adicionada) e com a água de ensaio e a substância de referência deverão ser tratados da mesma forma que os frascos de ensaio propriamente ditos, aos quais foi acrescentada a substância em estudo, dissolvida num solvente. O objectivo dos controlos do solvente é analisar a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos causados pelo solvente sobre a população microbiana e que tenham efeitos sobre a degradação da substância de referência.

1.8.8. **Condições de ensaio**

1.8.8.1. *Temperatura de ensaio*

A incubação deve ser feita em local escuro (de preferência) ou com luz difusa e a temperatura controlada (± 2 °C), que poderá ser a temperatura de campo ou uma temperatura normalizada de 20-25 °C. A temperatura de campo pode ser entendida como a temperatura real da amostra no momento da colheita ou como a temperatura média no local da recolha.

1.8.8.2. *Agitação*

Os frascos devem ser agitados ou mexidos em contínuo, para que as partículas e microorganismos se mantenham em suspensão. A agitação servirá igualmente para facilitar a transferência de oxigénio a partir do espaço livre acima do líquido, de modo a que as condições aeróbicas sejam mantidas de forma adequada. Colocar os frascos numa mesa de agitação (aproximadamente 100 rpm) ou utilizar agitação magnética. A agitação deve ser contínua, mas tão suave quanto possível, desde que permita manter uma suspensão homogénea.

1.8.8.3. *Duração do ensaio*

A duração do ensaio não deverá normalmente ultrapassar os 60 dias, a não ser que se utilize um regime de ensaio semicontínuo, com renovação periódica da suspensão de ensaio (ver o ponto 1.8.6 e o anexo 2). O período dos ensaios em descontínuo poderá, no entanto, ser alargado até um máximo de 90 dias, se a degradação da substância em estudo se tiver iniciado durante os primeiros 60 dias. A degradação será acompanhada, a intervalos apropriados, pela determinação da actividade residual do ^{14}C ou da evolução do $^{14}CO_2$ (ver o ponto 1.8.9.4) e/ou por análise química (ver o ponto 1.8.9.5). O período de incubação deve ser suficientemente longo para permitir a avaliação do processo de degradação. A degradação deverá, de preferência, ultrapassar os 50 %; no caso das substâncias de degradação lenta, a percentagem de degradação deve ser suficiente (normalmente superior a 20 %) para permitir a estimação de uma taxa constante de degradação cinética.

▼M1

O pH e a concentração de oxigénio do sistema de ensaio devem ser medidos periodicamente, a não ser quando a experiência anterior de ensaios semelhantes com amostras de água e de sedimentos recolhidos no mesmo local faça com que isso não seja necessário. Em certas condições, o metabolismo dos substratos primários presentes a concentrações muito elevadas na água ou nos sedimentos poderá eventualmente resultar numa produção de CO_2 e numa depleção do oxigénio suficientes para alterar de forma significativa as condições experimentais durante o ensaio.

1.8.9. **Procedimento**

1.8.9.1. *Preparação dos frascos para o ensaio pelágico*

Transferir um volume adequado de água de ensaio para os frascos, enchendo até cerca de um terço do volume total, pelo menos com 100 ml. Se se utilizarem diversos frascos (de forma a permitir a recolha de um frasco inteiro em cada amostra), o volume de água de ensaio mais indicado será também de cerca de 100 ml, já que a utilização de volumes menores poderá ter influência sobre a duração da fase de latência. A substância em estudo é adicionada a partir de uma solução de reserva, como se descreve nos pontos 1.8.2 e 1.8.7. Para a determinação da cinética de degradação e para o cálculo da taxa constante de degradação cinética, devem ser utilizadas pelo menos duas concentrações diferentes da substância em estudo, com um factor de concentração entre 5 e 10. Ambas as concentrações devem ser inferiores a 100 μg/l e, de preferência, estar compreendidas no intervalo entre <1 e 10 μg/l.

Fechar os frascos com rolhas ou tampas impermeáveis ao ar e ao CO_2. No caso dos ensaios de substâncias químicas não marcadas com ^{14}C e não voláteis, podem ser utilizadas simples tampas de algodão que evitem a contaminação (ver o ponto 1.8.1), desde que se saiba que os principais metabolitos também não são voláteis e que se utilize um método indirecto para a determinação do CO_2 (ver o anexo 3).

Incubar os frascos à temperatura escolhida (ver o ponto 1.8.8.1). Retirar amostras para a análise química ou para a medição do ^{14}C no início do ensaio (ou seja, antes de começar a biodegradação, ver o ponto 1.7.1) e depois a intervalos adequados durante o ensaio. A amostragem pode ser efectuada retirando subamostras (p.ex.: aliquotas de 5 ml) de cada replicado ou recolhendo um frasco inteiro em cada momento de amostra. A mineralização da substância em estudo pode ser determinada de forma directa ou indirecta (ver o anexo 3). Normalmente, uma estimativa fiável da constante de degradação exige, no mínimo, 5 pontos de amostragem durante a fase de degradação (ou seja, após o final da fase de latência), a não ser quando se possa provar que três pontos são suficientes para as substâncias de degradação rápida. Quanto às substâncias que não são rapidamente degradadas, a obtenção de mais pontos durante a fase de degradação não deve constituir nenhuma dificuldade, pelo que se deverão utilizar mais pontos de amostragem para a estimativa de k. Não é possível indicar nenhum calendário fixo de amostragem, dada a variação das taxas de biodegradação; no entanto a recomendação, nos casos em que a degradação seja lenta, é que se efectuem amostras uma vez por semana. Se a substância em estudo se degradar rapidamente, deve ser feita uma amostra por dia durante os primeiros três dias e, depois disso, uma amostra a cada dois ou três dias. Em determinadas circunstâncias, como por exemplo substâncias de hidrólise rápida, poderá ser necessário proceder a uma amostragem de hora a hora. Recomenda-se a realização de um estudo prévio ao ensaio, de modo a determinar o intervalo de amostragem mais adequado. Se as amostras tiverem de ser conservadas para posterior realização de análises específicas, será aconselhável retirar um número maior de amostras e depois, no final do estudo, seleccionar as que serão analisadas de trás para a frente, ou seja, analisando primeiro as últimas amostras (ver o segundo parágrafo do ponto 1.8.9.5 para mais orientações sobre a estabilidade das amostras durante o armazenamento).

▼**M1**

1.8.9.2. *Número de frascos e de amostras*

Preparar um número suficiente de frascos de ensaio para incluir:

— frascos de ensaio; frascos pelo menos em duplicado (e, de preferência, um mínimo de três) para cada concentração da substância em estudo ou diversos frascos por concentração, quando se recolherem frascos inteiros em cada momento de amostragem (representados pelo símbolo F_T),

— frascos de ensaio para o cálculo do balanço de massas; frascos pelo menos em duplicado para cada concentração em estudo (representados pelo símbolo F_M),

— controlos «brancos», sem adição da substância em estudo; pelo menos um frasco de ensaio «branco», contendo apenas água de ensaio (representado pelo símbolo F_B),

— controlo de referência; frascos em duplicado, com a substância de referência (p.ex.: anilina ou benzoato de sódio, a 10 µg/l) (representados pelo símbolo F_C). O objectivo do controlo de referência é confirmar a existência de uma actividade microbiana mínima. Quando for conveniente, poderá ser utilizada uma substância de referência marcada com um isótopo, mesmo nos casos em que a degradação da substância em estudo seja acompanhada por análise química,

— controlo estéril; um ou dois frascos com água de ensaio esterilizada, para analisar a possível degradação abiótica ou outro tipo de eliminação não-biológica da substância em estudo (representados pelo símbolo F_S); A actividade biológica pode ser interrompida por tratamento em autoclave (121º C; 20 min) da água de ensaio, pela adição de um produto tóxico (p.ex.: azoteto de sódio (NaN_3) a 10-20 g/l, cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) a 100 mg/l ou formalina a 100 mg/l) ou por irradiação com raios gama. Se se utilizar $HgCl_2$, deve ser eliminado como resíduo tóxico. No caso de águas com grande quantidade de sedimento, nem sempre é fácil conseguir obter condições de esterilidade; nesses casos, recomenda-se a repetição do tratamento em autoclave (p.ex.: três vezes). Deve ter-se em atenção que as características de adsorção do sedimento poderão ser alteradas pelo tratamento em autoclave,

— controlos do solvente, contendo água de ensaio e água de ensaio com a substância de referência; frascos em duplicado, tratados com a mesma quantidade de solvente e sujeitos ao mesmo procedimento que os frascos a que foi adicionada a substância em estudo. O objectivo é verificar os eventuais efeitos adversos do solvente, através da determinação da degradação da substância de referência.

Para a definição do método de ensaio, o investigador deverá tomar em consideração a importância relativa do aumento do número de replicados contra o aumento do número de pontos de amostragem. O número exacto de frascos que serão necessários dependerá do método utilizado para a medição da degradação (ver o terceiro parágrafo do ponto 1.8.9.1, o ponto 1.8.9.4 e o apêndice 3).

▼**M1**

Em cada momento de amostragem, devem ser retiradas de cada frasco de ensaio duas subamostras (p.ex.: aliquotas de 5 ml). Se se utilizar um regime com amostragem de frascos inteiros em cada momento de amostragem, devem ser sacrificados dois frascos para cada amostra (ver o primeiro parágrafo do ponto 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Preparação dos frascos para o ensaio com sedimento em suspensão (facultativo)*

Acrescentar os volumes necessários de água de ensaio e de sedimento, se for o caso, aos frascos de ensaio (ver o ponto 1.8.5). A preparação dos frascos para o ensaio com sedimento em suspensão é idêntica à dos frascos para o ensaio pelágico (ver os pontos 1.8.9.1 e 1.8.9.2). Utilizar, de preferência, frascos de soro ou de forma semelhante. Colocar os frascos num agitador, em posição horizontal. Como é óbvio, os frascos abertos, utilizados para as substâncias não voláteis e não marcadas com ^{14}C devem ser colocados em posição vertical; nesse caso, recomenda-se a utilização de agitação magnética, com barras de agitação revestidas a vidro. Se necessário, arejar os frascos para manter condições aeróbicas adequadas.

1.8.9.4. *Determinações radioquímicas*

O $^{14}CO_2$ resultante da degradação é medido de forma directa e indirecta (ver o apêndice 3). O $^{14}CO_2$ é determinado indirectamente pela diferença entre a actividade ^{14}C inicial na água ou suspensão de ensaio e a actividade total residual no momento da amostra, medida após acidificação da amostra a pH 2-3 e purga do CO_2. Dessa forma, o carbono inorgânico é removido, pelo que a actividade residual medida provém do material orgânico. A determinação indirecta do $^{14}CO_2$ não deve ser utilizada quando os principais metabolitos da degradação da substância de ensaio sejam voláteis (ver o apêndice 3). Se possível, a evolução do $^{14}CO_2$ deverá ser medida de forma directa (ver o apêndice 3), em cada momento de amostragem, em pelo menos um frasco de ensaio; esse procedimento permite, por um lado, obter os balanços mássicos e, por outro, verificar a evolução do processo de degradação, mas está limitado aos ensaios conduzidos com frascos fechados.

Se o $^{14}CO_2$ resultante da degradação for medido directamente durante o ensaio, devem ser previstos, no início do mesmo, um número suficiente de frascos para o efeito. A determinação directa do $^{14}CO_2$ é recomendada nos casos em que os principais metabolitos resultantes da transformação da substância em estudo sejam voláteis. Em cada ponto de medição, os frascos adicionais serão acidificados até pH de 2-3 e o $^{14}CO_2$ será recolhido num adsorvente interno ou externo (ver o apêndice 3).

A título facultativo, as concentrações da substância em estudo marcada com ^{14}C e dos principais metabolitos poderão ser determinadas por radiocromatografia (p.ex.: cromatografia em camada fina, RAD--TLC) ou por HPLC com detector de radionuclídeos.

Ainda a título facultativo, poderá determinar-se a distribuição da radioactividade remanescente pelas diferentes fases (ver o apêndice 1) e a concentração residual da substância em estudo e dos metabolitos.

▼M1

No final do ensaio, o balanço mássico deverá ser determinado através de medição directa do $^{14}CO_2$, utilizando frascos de ensaio diferentes, dos quais não tenham sido retiradas amostras durante o ensaio (ver o apêndice 3).

1.8.9.5. *Análise química específica*

Se existir um método analítico específico com uma sensibilidade suficiente, a biodegradação primária poderá ser avaliada medindo a concentração residual total da substância de ensaio, em vez de utilizar técnicas de radiomarcação. Se for utilizada uma substância marcada com um radioisótopo (para medição da mineralização total), poderão ser efectuadas em paralelo análises químicas específicas, a fim de obter informação adicional que possa ser útil e de verificar o procedimento utilizado. As análises químicas específicas poderão igualmente ser utilizadas para a medição dos metabolitos formados durante a degradação da substância em estudo, sendo recomendadas para as substâncias que mineralizam com uma meia-vida superior a 60 dias. A concentração da substância em estudo e dos respectivos metabolitos deve ser determinada e comunicada para cada momento de amostragem (sob a forma de uma concentração e, quando aplicável, de uma percentagem). Em geral, os metabolitos detectados com uma concentração ≥ 10 % da concentração aplicada em qualquer momento do ensaio devem ser identificados, a não ser que a sua presença possa ser razoavelmente justificada por qualquer outro mecanismo que não a degradação da substância em estudo. Deverá considerar-se a hipótese de identificação de todos os metabolitos cuja concentração aumente continuamente ao longo do ensaio, mesmo que a sua concentração nunca ultrapasse o limite acima indicado, já que essa característica poderá indicar que se trata de produtos persistentes. A análise dos metabolitos nos controlos estéreis deve ser ponderada nos casos em que se considera possível a ocorrência de transformação biótica rápida (hidrólise) da substância em estudo. A necessidade de quantificação e de identificação dos metabolitos deve ser ponderada numa base casuística, devendo, quando for realizada, ser justificada no relatório de ensaio. As técnicas de extracção com solventes orgânicos devem ser aplicadas de acordo com as instruções apresentadas nos respectivos procedimentos analíticos.

As amostras devem ser conservadas hermeticamente fechadas entre 2 e 4 °C, se a análise for realizada num prazo de 24 horas (preferível). Para um armazenamento mais prolongado, as amostras devem ser congeladas abaixo dos – 18 °C ou conservadas com adição de químicos. A acidificação não é um método recomendado para a conservação das amostras, na medida em que as amostras acidificadas poderão ser instáveis. Se as amostras não forem analisadas num prazo de 24 horas e forem armazenadas por um período prolongado, deverá proceder-se a um estudo de estabilidade durante o armazenamento, a fim de demonstrar a estabilidade das substâncias de interesse em condições de armazenamento a – 18 °C ou com conservantes químicos. Se o método analítico implicar a extracção com solventes ou em fase sólida (SPE), essa extracção deverá ser efectuada imediatamente após a amostragem ou depois de conservar a amostra refrigerada por um prazo máximo de 24 horas.

Dependendo da sensibilidade do método analítico, poderá ser necessário recolher volumes superiores aos que são indicados no ponto 1.8.1. O ensaio pode ser realizado de forma simples com volumes de ensaio de 1 l, em frascos com uma capacidade de 2-3 l, o que torna possível a recolha de amostras de aproximadamente 100 ml.

▼M1

2. **RESULTADOS E APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

2.1.1. **Apresentação dos resultados**

Arredondar os momentos de amostragem às horas (a não ser nos casos em que a substância em estudo se degrade substancialmente numa questão de minutos ou de horas), mas não aos dias. Marcar num gráfico as estimativas da actividade residual da substância em estudo (para as substâncias marcadas com ^{14}C) ou da concentração residual (para as substâncias não marcadas) em função do tempo, tanto em papel milimétrico como em papel semilogarítmico (ver as figuras 1a, 1b). Se tiver ocorrido degradação, comparar os resultados dos frascos F_T com os dos frascos F_S. Se as médias dos resultados dos frascos com a substância de ensaio (F_T) e dos frascos estéreis (F_S) apresentarem um desvio inferior a 10 %, pode assumir-se que a degradação observada se deve principalmente a factores abióticos. Se a degradação for menor nos frascos F_S, os respectivos valores poderão ser utilizados para corrigir (por subtracção) os valores relativos aos frascos F_T, de modo a poder estimar a dimensão da biodegradação. Quando se efectuarem análises facultativas dos principais metabolitos, os gráficos da sua formação e destruição devem ser apresentados, juntamente com um gráfico da evolução da concentração da substância em estudo.

Estimar a duração da fase de latência, t_L, a partir da curva de degradação (gráfico semilogarítmico), extrapolando a sua parte linear até ao ponto de degradação zero ou, em alternativa, determinando o tempo necessário para que ocorra uma degradação de cerca de 10 % (ver as figuras 1a e 1b). A partir do gráfico semilogarítmico, estimar a constante de primeira ordem k e o respectivo erro-padrão, por regressão do ln (valor residual da actividade ^{14}C ou da concentração da substância) em função do tempo. Em relação às medições do ^{14}C, em particular, utilizar apenas os dados da parte inicial linear da curva, após o final da fase de latência, sendo preferível que se seleccionem poucos pontos que sejam significativos do que um número maior de pontos afectados de maior incerteza. Os factores de incerteza incluem, nesse caso, os erros inerentes à medição directa da actividade residual do ^{14}C, que é recomendada (ver abaixo). Por vezes, poderá ser relevante calcular duas constantes diferentes, quando a degradação apresentar duas fases bem distintas. Para tal, devem ser definidas as duas fases da curva de degradação. Os cálculos da taxa constante k e da meia-vida $t_{½} = \ln 2/k$ devem ser efectuados para cada um dos frascos replicados, quando forem retiradas subamostras de um mesmo frasco, ou utilizando valores médios, quando se recolherem frascos inteiros em cada momento de amostragem (ver o último parágrafo do ponto 1.8.9.2). Quando for utilizado o primeiro desses procedimentos, deverão apresentar-se a taxa constante e a meia-vida para cada um dos frascos replicados e ainda o seu valor médio, com o respectivo desvio padrão. Se se tiverem usado concentrações elevadas da substância em estudo, a curva de degradação poderá desviar-se consideravelmente de uma linha recta (gráfico semilogarítmico), caso em que não será válida uma cinética de primeira ordem. Logo, a definição a meia-vida deixará de fazer sentido. É possível, no entanto, que se possa aplicar uma cinética de pseudo primeira ordem numa gama limitada de concentrações, o que poderá permitir a definição do meio-tempo de degradação DT_{50} (tempo necessário para uma degradação de 50 %). Contudo, deve tomar-se em consideração que o decurso da degradação para lá da gama de concentrações seleccionada não pode ser previsto utilizando esse DT_{50}, que apenas descreve um conjunto específico de resultados. Existem diversos instrumentos analíticos que podem facilitar os cálculos estatísticos e o ajustamento das curvas, sendo recomendada a utilização de programas informáticos desse tipo.

▼M1

Se forem realizadas análises químicas específicas, calcular as taxas constantes e as meia-vida da degradação primária, como se descreve acima, para o caso da mineralização total. Se a degradação primária constituir o processo limitante, poderá ser possível, em certos casos, utilizar pontos de toda a curva de degradação. Isto acontece porque a medição, ao contrário do que acontece com as medições da actividade do ^{14}C, é directa.

Se forem utilizadas substâncias marcadas com ^{14}C, deve ser apresentado, pelo menos em relação ao momento final do ensaio, um balanço de massas expresso em percentagem da concentração inicial aplicada.

2.1.2. **Actividade residual**

Quando a parte de uma substância orgânica que está marcada com ^{14}C é biodegradada, a maior parte do ^{14}C é convertido em $^{14}CO_2$, enquanto que outra parte é utilizada para a produção de biomassa e/ou para a síntese de metabolitos extracelulares. Logo, a degradação completa «final» de uma substância não resulta numa conversão de 100 % do respectivo carbono em $^{14}CO_2$. O ^{14}C integrado em metabolitos da biosíntese é posteriormente libertado, de forma lenta, como $^{14}CO_2$, num processo de «mineralização secundária». Por esse motivo, a actividade residual do ^{14}C orgânico (medida após purga do CO_2) ou do $^{14}CO_2$ produzido em função do tempo apresenta uma parte final com um declive muito baixo, após a conclusão da degradação. Esse factor vem complicar a interpretação cinética dos dados e, portanto, só a parte inicial da curva (a partir do final da fase de latência e até à degradação de aproximadamente 50 % da substância presente) deverá normalmente ser utilizada para a estimação de uma taxa constante de degradação. Se a substância em estudo for degradada, a actividade total do ^{14}C orgânico residual será sempre superior à actividade do ^{14}C associada à substância em estudo que permanece intacta. Se a substância em estudo for degradada segundo uma cinética de primeira ordem e se uma fracção constante, α, for mineralizada em CO_2, o declive inicial da curva de desaparecimento do ^{14}C (^{14}C orgânico total em função do tempo) será α vezes superior ao declive da correspondente curva de concentração da substância em estudo (ou, em termos mais precisos, da parte da substância em estudo marcada com ^{14}C). Se se utilizarem as medições não corrigidas da actividade total de ^{14}C orgânico, a taxa constante de degradação calculada será, portanto, subavaliada. A literatura especializada descreve alguns procedimentos para a estimação das concentrações da substância em estudo a partir da actividade radioquímica medida, com base em diversos pressupostos de simplificação (2)(9)(10)(11). Esses procedimentos serão mais facilmente aplicáveis às substâncias de degradação rápida.

2.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Se se constatar que k é independente da concentração adicionada (ou seja, se o k calculado for aproximadamente o mesmo para todas as concentrações da substância em estudo), poderá assumir-se que a taxa constante de primeira ordem é representativa das condições de ensaio utilizadas, ou seja, da substância em estudo, da amostra de água e da temperatura de ensaio. Só a experiência permitirá decidir até que ponto os resultados podem ser generalizados ou extrapolados para outros sistemas. Se se utilizar uma concentração elevada da substância em estudo e se a degradação não ocorrer, portanto, segundo uma cinética de primeira ordem, os dados não poderão ser utilizados para a estimação directa de uma taxa constante de primeira ordem ou da correspondente meia-vida. No entanto, os dados recolhidos a partir de um ensaio com elevada concentração da substância em estudo poderão ainda ser utilizáveis para a estimação do grau de mineralização total e/ou dos limites de detecção e de quantificação dos metabolitos.

▼M1

Se as taxas de outros processos, diferentes da biodegradação, que causam a perda da substância (p.ex.: hidrólise ou volatilização) forem conhecidas, poderão ser subtraídas da taxa líquida de desaparecimento da substância observada ao longo do ensaio, de modo a obter uma estimativa aproximada da taxa de biodegradação. Os dados relativos à hidrólise podem se obtidos, por exemplo, a partir dos frascos de controlo estéreis ou de ensaios paralelos com uma concentração mais elevada da substância em estudo.

A determinação, directa e indirecta, do $^{14}CO_2$ (ponto 1.8.9.4 e anexo 3) só pode ser utilizada para medir o grau de mineralização da substância em estudo em CO_2. A radiocromatografia (RAD-TLC) ou o HPLC podem ser utilizados para analisar as concentrações da substância de ensaio marcada com ^{14}C e a formação dos principais metabolitos (ver o terceiro parágrafo do ponto 1.8.9.4). A fim de permitir a estimação directa da meia-vida, é necessário que não esteja presente nenhum dos principais metabolitos (definidos como os metabolitos cuja concentração é ≥ 10 % da quantidade da substância em estudo utilizada. Se estiverem presentes metabolitos principais, de acordo com essa definição, será necessário proceder a uma análise pormenorizada dos dados. Essa análise poderá incluir a repetição de ensaios e/ou a identificação dos metabolitos (ver o primeiro parágrafo do ponto 1.8.9.5), a não ser quando o destino dos produtos de transformação possa ser razoavelmente avaliado com base na experiência adquirida (p.ex.: informação sobre a sequência de reacções da degradação). Na medida em que a proporção do carbono da substância em estudo que é transformada em CO_2 varia (dependendo, em grande medida, da concentração da substância e de outros substratos disponíveis, das condições de ensaio e da população microbiana), este ensaio não permite uma estimação simples da biodegradação final, como acontece com o ensaio de redução gradual do COD, mas o seu resultado é semelhante ao obtido no caso dos ensaios respirométricos. O grau de mineralização será, portanto, menor ou igual do que o nível mínimo da degradação final. Para conseguir obter uma imagem mais completa da biodegradação final (mineralização e incorporação sob a forma de biomassa), deverá ser efectuada, no final do ensaio, uma análise da distribuição do ^{14}C pelas diferentes fases (ver o apêndice 1). O ^{14}C presente na fase particulada será composto pelo ^{14}C incorporado na biomassa bacteriana e pelo ^{14}C adsorvido sobre outras partículas orgânicas.

2.3. VALIDADE DO ENSAIO

Se a substância de referência não for degradada durante o período em que isso seria de esperar (no caso da anilina e do benzoato de sódio, normalmente menos de duas semanas), a validade do ensaio será duvidosa e deverá ser verificada de forma mais aprofundada; em alternativa, o ensaio deverá ser repetido com uma nova amostra de água. Durante um ensaio de anel ISO do presente método, com a participação de sete laboratórios de toda a Europa, as constantes da taxa de degradação para a anilina variaram entre 0,3 e 1,7 dia^{-1}, com uma média de 0,8 d^{-1} a 20 ºC e um desvio-padrão de ± 0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 dias). A fase de latência tipicamente observada é de 1 a 7 dias. As águas analisadas tinham, de acordo com os relatórios apresentados, uma biomassa bacteriana correspondente a 10^3 -10^4 unidades formadoras de colónias (CFU) por ml. As taxas de degradação medidas nas águas ricas em nutrientes da Europa Central foram superiores às das águas nórdicas, oligotróficas, o que poderá dever-se a uma situação trófica diferente ou a uma exposição anterior a substâncias químicas.

A recuperação total (balanço de massas) no final da experiência deverá situar-se entre os 90-110 % para as substâncias marcadas com um radioisótopo, enquanto que a recuperação inicial no início da experiência se deverá situar entre os 70-110 % para as substâncias não marcadas. No entanto, estes intervalos devem ser interpretados como um objectivo, não devendo ser utilizados como critério de aceitação do ensaio.

▼M1

3. **RELATÓRIO DE ENSAIO**

O relatório deve indicar claramente o tipo de ensaio, ou seja, se se trata de um ensaio pelágico ou com sedimento em suspensão, para além da seguinte informação:

Substância em estudo e substância(s) de referência:

— nomes comuns, nomes químicos (nomes IUPAC e/ou CAS recomendados), números CAS, fórmulas estruturais (indicando a posição do ^{14}C, quando se utilizarem substâncias marcadas) e propriedades físico-químicas relevantes da substância em estudo e da substância de referência (ver os pontos 1.5 e 1.6),

— nomes químicos, números CAS, fórmulas estruturais (indicando a posição do ^{14}C, quando se utilizarem substâncias marcadas) e propriedades físico-químicas relevantes das substâncias utilizadas como padrão para a identificação e quantificação dos metabolitos,

— pureza (impurezas) da substância em estudo e das substâncias de referência,

— pureza radioquímica da substância marcada e respectiva actividade específica (se aplicável).

Águas de superfície:

Deve ser fornecida, no mínimo, a seguinte informação em relação à amostra de água:

— localização e descrição do local de amostragem, incluindo, se possível, os antecedentes conhecidos em termos de poluição,

— data e hora da recolha da amostra,

— nutrientes (N total, amónio, nitritos, nitratos, P total, ortofosfatos dissolvidos),

— profundidade da colheita,

— aspecto da amostra (p.ex.: cor e turbidez),

— COD e COT,

— CBO,

— temperatura e pH no local e momento da amostragem,

— oxigénio ou potencial redox (obrigatório apenas quando as condições aeróbicas não sejam óbvias),

— salinidade e condutividade (no caso da água do mar e da água salobra),

— sólidos em suspensão (caso a amostra se apresente turva),

— eventualmente, outra informação relevante acerca do local de amostragem no momento da mesma (p.ex.: dados actuais ou passados sobre o caudal dos rios ou correntes marinhas, descargas importantes que se encontram próximas e o respectivo tipo, condições meteorológicas que precederam a recolha da amostra),

e, facultativamente:

— biomassa microbiana (p.ex.: contagem directa com laranja de acridina ou número de unidades formadoras de colónias),

▼M1

— carbono inorgânico,

— concentração de clorofila-a, como estimativa específica da biomassa de algas.

Quando se proceder a um ensaio com sedimentos em suspensão, deverá também ser fornecida a seguinte informação sobre os sedimentos:

— profundidade da colheita de sedimento,

— aparência do sedimento (p.ex.: colorido, lamacento, lodoso ou arenoso),

— textura (p.ex.: % de areão, de areia fina, de lodo e de argilas),

— peso seco dos sólidos em suspensão, em g/l, concentração do COT ou perda de peso após combustão, como medição do conteúdo em matéria orgânica,

— pH,

— oxigénio ou potencial redox (obrigatório apenas quando as condições aeróbicas não sejam óbvias).

Condições de ensaio:

— período decorrido entre a recolha das amostras e a respectiva utilização no ensaio, condições de armazenamento e de pré-tratamento das amostras, data de realização dos estudos,

— quantidade da substância em estudo aplicada, concentrações de ensaio e substância de referência,

— método de aplicação da substância em estudo, incluindo a eventual utilização de solventes,

— volume de água de superfície e de sedimentos (se aplicável) utilizados, e volume recolhido em cada amostra para fins de análise,

— descrição do sistema de ensaio utilizado.

Se as culturas não forem mantidas em ambiente escuro, informação sobre as condições de «luz difusa»:

— informação sobre o(s) método(s) utilizado(s) para a preparação dos controlos estéreis (p.ex.: temperatura, duração e número de tratamentos em autoclave),

— temperatura de incubação,

— informação sobre as técnicas analíticas e sobre o(s) método(s) utilizado(s) para as medições da actividade radioquímica, para a verificação dos balanços de massa e para a medição da distribuição pelas fases (se for efectuada),

— número de replicados.

Resultados:

— percentagens de recuperação (ver o ponto 1.7.1),

— reproductividade e sensibilidade dos métodos analíticos utilizados, incluindo os respectivos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) (ver o ponto 1.7.2),

▼M1

— todos os dados medidos (incluindo o momento das amostragens), tabela com os valores calculados e curvas de degradação; para cada concentração estudada e para cada frasco replicado, apresentar o coeficiente de correlação linear correspondente ao declive do gráfico logarítmico, a duração estimada da fase de latência e (se possível) uma taxa constante de primeira ordem ou de pseudo primeira ordem, bem como a correspondente meia-vida (ou período de meia-vida, t_{50}),

— comunicar os valores relevantes, p.ex.: duração da fase de latência, taxa constante e meia-vida de degradação (ou t_{50}), sob a forma de uma média dos resultados observados nos diferentes replicados,

— classificar o sistema como adaptado ou não-adaptado, a julgar pelo aspecto da curva de degradação e pela possível influência da concentração de ensaio,

— resultados da verificação final dos balanços de massa e das medições da distribuição pelas diferentes fases (se efectuadas),

— fracção do ^{14}C mineralizada e, caso sejam utilizadas análises específicas, nível final da degradação primária,

— identificação, concentração molar e percentagem da substância aplicada e dos principais metabolitos (ver o primeiro parágrafo do ponto 1.8.9.5), quando aplicável,

— proposta de esquema da sequência de reacções, quando aplicável,

— discussão dos resultados.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test.

2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations — Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

4. Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality — Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Water quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, N.º 22.

▼**M1**

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394-401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999). Ring test report: Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 — report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/-sediment suspensions.

▼M1

Apêndice 1

Distribuição do ^{14}C pelas diferentes fases

Para efeitos da verificação do procedimento, as medições rotineiras da actividade residual do ^{14}C orgânico total (TOA) devem ser complementadas por medições dos balanços de massa, que indicam a determinação directa do $^{14}CO_2$ produzido após captura num adsorvente (ver o anexo 3). A formação de $^{14}CO_2$ representa, por si só, uma prova directa de biodegradação, por oposição à degradação abiótica ou a outros mecanismos de redução da concentração da substância, como a volatilização ou a adsorção. Alguma informação útil para a caracterização do comportamento em termos de biodegradabilidade pode ser obtida medindo a distribuição do TOA entre a fase de solução (actividade do ^{14}C orgânico dissolvido, DOA) e a fase particulada (actividade do ^{14}C orgânico particulado, POA), após separação das partículas por filtração através de membrana ou por centrifugação. A POA consiste na substância adsorvida sobre a biomassa microbiana e sobre outras partículas, para além do carbono marcado proveniente da substância em estudo e que tenha sido utilizado para a síntese de novo material celular, sendo assim incorporado na fracção da biomassa particulada. A formação de material orgânico dissolvido com ^{14}C pode ser estimada pela DOA no final da biodegradação (parte em que a curva da degradação em função do tempo passa a ser paralela ao eixo dos ×).

Estimar a distribuição do ^{14}C pelas fases em amostras seleccionadas, por filtração das amostras através de um filtro de membrana com diâmetro de poro de 0,22 μm ou de 0,45 μm, num material que não seja significativamente adsorvente em relação à substância em estudo (os filtros de policarbonato poderão servir). Caso a adsorção da substância em estudo no filtro seja demasiado importante para que possa ser ignorada (a verificar antes de iniciar a experiência) poderá utilizar-se, em vez da filtração, um procedimento de centrifugação a alta velocidade (2 000 g, 10 min).

Proceder à filtração ou à centrifugação de amostras não filtradas, como se descreve no anexo 3. Dissolver os filtros de membrana num fluído de cintilação adequado e proceder à contagem do modo habitual, utilizando apenas o método do rácio externo padrão para corrigir a atenuação, ou utilizar um oxidante das amostras. Se se tiver procedido a centrifugação, ressuspender o *pellet* formado pela fracção particulada em 1-2 ml de água destilada e transferir para uma célula de cintilómetro. Lavar duas vezes com 1 ml de água destilada e transferir a água da lavagem para a célula. Se necessário, a suspensão poderá ser colocada num gel para a contagem por cintilação em meio líquido.

▼M1

Apêndice 2

Procedimento semicontínuo

Para conseguir chegar a uma degradação suficiente das substâncias mais recalcitrantes, poderá ser necessário incubar as culturas durante períodos que poderão chegar a vários meses. A duração do ensaio não deverá normalmente ultrapassar 60 dias, a não ser quando as características da amostra original da água possam ser mantidas através da renovação da suspensão de ensaio. O período de ensaio poderá, no entanto, ser alargado até um máximo de 90 dias, sem renovação da suspensão de ensaio, se a degradação da substância em estudo se tiver iniciado durante os primeiros 60 dias.

Durante a incubação por longos períodos, a diversidade da comunidade microbiana poderá reduzir-se devido a diferentes mecanismos de perda e também ao esgotamento de nutrientes essenciais e substratos primários de carbono na água de ensaio. Assim, recomenda-se a utilização de um ensaio em semicontínuo, a fim de determinar de forma apropriada a taxa de degradação das substâncias em que esse processo é mais lento. O ensaio deve ser iniciado utilizando um procedimento semicontínuo quando a experiência anterior mostrar que será necessário um período de incubação de três meses para conseguir a degradação de 20 % da substância presente. Se não for esse o caso, o ensaio normal, em modo descontínuo, poderá ser transformado num ensaio semicontínuo se não se observar nenhuma degradação da substância em estudo durante aproximadamente 60 dias de ensaio em descontínuo. Pode interromper-se o procedimento semicontínuo e continuar o ensaio em descontínuo a partir do momento em que se tenha registado uma degradação substancial (p.ex.: > 20 %).

No ensaio semicontínuo, cerca de um terço do volume da suspensão de ensaio será substituída, a cada quinze dias, por água acabada de recolher à qual foi adicionada a substância em estudo à concentração inicial pretendida. Se o ensaio for realizado com sedimento em suspensão, o sedimento será igualmente adicionado à água de substituição, com a mesma concentração inicial do ensaio (entre 0,01 e 1 g/l). Para efeitos da realização de um ensaio com sólidos sedimentares em suspensão, é importante manter o sistema em suspensão permanente, mesmo durante a mudança de água, e um tempo de residência seja idêntico para os sólidos e para a água, já que de outra forma a pretendida similaridade com um sistema aquoso homogéneo sem fases definidas não estará garantida. Por essas razões, quando se utilizar o regime semicontínuo será preferível utilizar uma concentração inicial de sólidos em suspensão na parte inferior do intervalo de concentrações sugerido.

A substância em estudo deve ser adicionada com uma concentração que faça com que a concentração inicial não seja ultrapassada aquando da renovação parcial da suspensão de ensaio, o que permitirá evitar os fenómenos de adaptação que ocorrem frequentemente a altas concentrações da substância em estudo. Na medida em que o procedimento implica tanto uma reinoculação como a compensação dos nutrientes e substratos primários entretanto esgotados, a diversidade microbiana original é reposta, pelo que o ensaio poderá, teoricamente, prolongar-se até ao infinito. Quando se utiliza o procedimento semicontínuo, é importante notar que a concentração residual da substância em estudo deve ser corrigida em função das quantidades removidas e adicionadas em cada renovação. A concentração total e a concentração em solução da substância de ensaio podem ser tratadas como equivalentes no caso dos compostos com baixa adsorção. A adsorção é insignificante (< 5 %), nas condições de ensaio (0,1-1 g sólidos/l) para as substâncias em que log Kow < 3 (válido para compostos lipofílicos neutros). Essa característica é ilustrada pelo seguinte exemplo: 0,1 g/l de sólidos correspondem, mais ou menos, a 10 mg de carbono por litro (fracção carbono, $f_C = 0{,}01$). Assumindo que:

Log K_{ow} (da substância de ensaio) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

Coeficiente de partição, $K_d = f_C \times K_{oc}$

logo, a fracção dissolvida da concentração total (C-água (C_w)/C-total (C_t) será:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Apêndice 3

Determinação do $^{14}CO_2$

Determinação indirecta do $^{14}CO_2$

Para as medições de rotina, o método indirecto é geralmente o mais rápido e preciso, quando a substância de ensaio e os respectivos metabolitos não forem voláteis. Transferir simplesmente amostras não filtradas, por exemplo com um volume de 5 ml, para células de cintiloscópio. A actividade das amostras deverá localizar-se inicialmente entre os 5 000 dpm-10 000 dpm (80-170 Bq), sendo a actividade mínima inicial, normalmente, da ordem dos 1 000 dpm. O CO_2 deve ser purgado após acidificação das amostras a pH 2-3 com uma ou duas gotas de HCl ou H_3PO_4 concentrado. A purga do CO_2 pode ser feita por borbulhamento com ar durante cerca de ½-1 hora. Em alternativa, agitar vigorosamente as células (p.ex.: em agitador orbital) durante 1-2 horas ou, com agitação menos vigorosa, de um dia para o outro. A eficiência da purga de CO_2 deve ser verificada (prolongando o período de arejamento ou de agitação). Adicionar depois um líquido de cintilação adequado para a contagem de amostras aquosas, homogeneizar a amostra num agitador orbital e determinar a radioactividade por contagem de cintilação do líquido, subtraindo a actividade de base encontrada nos brancos utilizados no ensaio (F_B). A não ser nos casos em que a água de ensaio seja muito corada ou contenha uma elevada concentração de partículas, as amostras devem normalmente apresentar uma atenuação uniforme, pelo que será suficiente proceder a correcções da atenuação utilizando um padrão externo. Se a água de ensaio se apresentar muito corada, poderá ser necessário proceder a uma correcção adicional da atenuação utilizando um padrão interno. Se a concentração de partículas for elevada poderá ser difícil obter uma solução ou gel homogéneo, ou poderão ocorrer variações de atenuação demasiado grandes de amostra para amostra. Nesse caso, poderá ser utilizado o método de contagem descrito abaixo para as lamas. Se o ensaio for realizado com sedimento em suspensão, a medição do $^{14}CO_2$ poderá ser efectuada indirectamente retirando uma amostra homogénea de 10 ml da água/suspensão de ensaio e separando as respectivas fases por centrifugação a uma velocidade apropriada (p.ex.: 40 000 m/s^2 durante 15 min). A fase aquosa deverá então ser tratada como se descreve acima. Para a determinação da actividade de ^{14}C da fase particulada (POA), ressuspender o sedimento num pequeno volume de água destilada, transferir para as células de cintiloscópio e adicionar líquido de cintilação de modo a formar um gel (existem líquidos de cintilação especiais para esse efeito). Dependendo da natureza das partículas (nomeadamente do respectivo teor de matéria orgânica), poderá ser viável proceder à digestão da amostra, de um dia para o outro, numa solução que dissolva os tecidos e depois à respectiva homogeneização em agitador orbital, antes de adicionar o líquido de cintilação. Em alternativa, a POA pode ser determinada por combustão em presença de oxigénio excedentário, utilizando um oxidador de amostras. Para a contagem, devem ser sempre incluídos padrões internos, podendo ser necessário proceder a correcções da atenuação por adição de um padrão interno a cada uma das amostras.

Determinação directa do $^{14}CO_2$

Se o $^{14}CO_2$ produzido for medido directamente, será necessário prever, no início do ensaio, um número suficiente de frascos, que serão recolhidos em cada momento de amostragem e acidificados a pH 2-3, sendo o $^{14}CO_2$ recolhido num adsorvente interno (colocado em cada frasco de ensaio no início do mesmo) ou externo. Como agente adsorvente, podem utilizar-se produtos alcalinos (p.ex.: solução 1 N ou *pellets* de NaOH), etanolamina ou um adsorvente baseado na etanolamina que se encontre disponível no mercado. Quando as medições do $^{14}CO_2$ sejam feitas de forma directa, os frascos de ensaio devem ser hermeticamente fechados, por exemplo com rolhas de borracha butírica.

▼**M1**

Figura 1a

Exemplo de um gráfico aritmético dos dados (actividade residual em função do tempo)

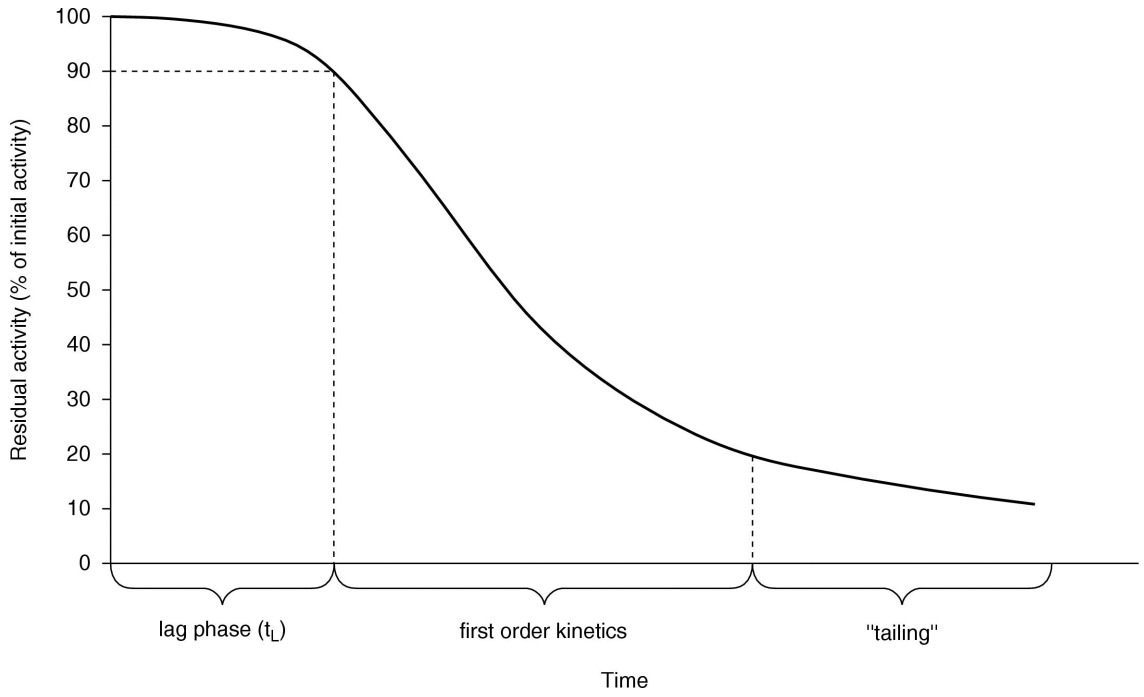
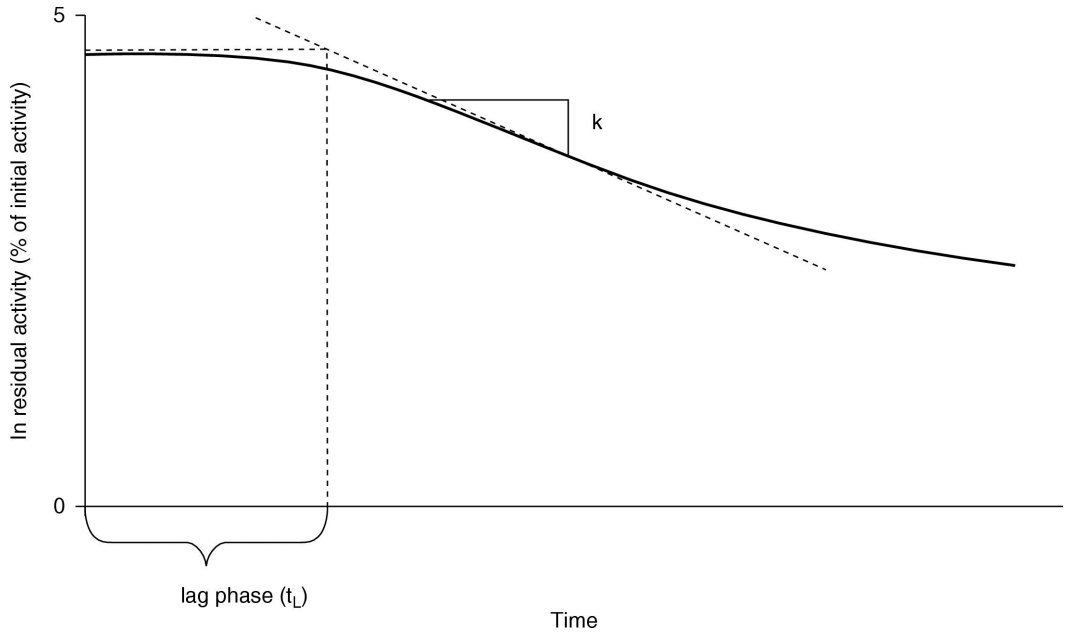


Figura 1b

Exemplo de um gráfico semilogarítmico dos dados (ln da actividade residual em função do tempo)



▼M1

C.26. ENSAIO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO COM *LEMNA* SPP.

1. MÉTODO

Este método é equivalente ao OECD TG 221 (2006). As autoridades da UE estão de acordo em afirmar que o ensaio com *Lemna* constitui uma alternativa adequada para o ensaio com algas de substâncias fortemente coradas (2)(3).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio foi concebido para avaliar a toxicidade de determinadas substâncias para as plantas aquáticas do Género *Lemna* (lentilha-de-água). O método é baseado em orientações existentes (4)(5)(6)(7)(8)(9), mas inclui modificações desses métodos para tomar em conta a investigação mais recente e as consultas realizadas em relação a uma série de questões. O método proposto foi validado por um ensaio de anel internacional (10).

O presente método de ensaio descreve ensaios de toxicidade que utilizam as espécies *Lemna gibba* e *Lemna minor*, que foram extensamente estudadas e são objecto das normas acima referidas. A taxonomia das *Lemna* spp. é difícil, sendo complicada pela existência de diversos fenótipos. Embora a resposta das *Lemna* aos agentes tóxicos possa ser afectada por variabilidade genética, a informação actualmente existente sobre essa fonte de variabilidade não é suficiente para permitir que se recomende um clone específico para a utilização no presente método de ensaio. Cabe aqui notar que embora o ensaio não seja realizado com culturas puras, são tomadas medidas, em diversas fases, para que a contaminação por outros organismos seja reduzida ao mínimo.

São descritos os pormenores do ensaio com renovação (semiestático e em contínuo) e sem renovação (estático) da solução de ensaio. Dependendo dos objectivos do ensaio e das exigências regulamentares, é recomendado que se analise a possibilidade de aplicação dos métodos semiestático e em contínuo, nomeadamente para as substâncias que desaparecem rapidamente da solução por efeito de volatilização, de fotodegradação, de precipitação ou de biodegradação. Para mais orientações, consultar a referência bibliográfica (11).

1.2. DEFINIÇÕES

Para efeitos do presente método de ensaio, foram utilizadas as seguintes definições e abreviaturas:

Biomassa: é o peso seco da matéria viva presente numa população. No presente ensaio são utilizadas algumas formas alternativas de medição da biomassa, como o número ou a superfície das frondes, sendo o termo «biomassa» utilizado também para essas medições alternativas.

Clorose: é o amarelecimento do tecido das frondes.

Clone: é um organismo ou célula obtido a partir de um único indivíduo por reprodução assexuada. Os indivíduos de um mesmo clone são, portanto, geneticamente idênticos.

Colónia: é um agregado de frondes (geralmente 2 a 4) progenitoras e descendentes, ligadas entre si. As colónias são por vezes designadas por «planta».

▼M1

EC_x: é a concentração da substância em estudo que, dissolvida no meio de ensaio, resulta numa redução de x % (p. ex.: 50 %) do crescimento da *Lemna*, após um determinado período de exposição (que deverá ser explicitamente mencionado nos casos em que se afaste da duração total ou normal do ensaio). A fim de indicar de forma inequívoca se o valor de EC se refere à taxa de crescimento ou ao rendimento, o símbolo «E_rC» é utilizado no primeiro caso e o símbolo «E_yC» no segundo, sendo seguidos da designação da variável de medição utilizada, p. ex.: E_rC (número de frondes).

Ensaio em contínuo: é um ensaio em que a solução em estudo é continuamente substituída.

Fronde: é uma estrutura individual/única, em «forma de folha», de uma planta de lentilha-de-água. Trata-se da mais pequena unidade, ou seja, indivíduo, capaz de reprodução.

Giba: é uma fronde que apresenta um aspecto irregular ou inchado.

Crescimento: é o aumento da variável de medição, que pode ser o número de frondes, o peso seco, o peso húmido ou a superfície das frondes, ao longo do período de ensaio.

Taxa de crescimento (taxa média de crescimento específico): é o aumento logarítmico da biomassa durante o período de exposição.

Menor concentração com efeito observável (LOEC): é a concentração mais baixa à qual se observa que a substância em estudo tem um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de redução do crescimento, quando comparada com o controlo, para um determinado período de exposição. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior ao verificado com a LOEC. Quando estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deverá ser fornecida uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, consequentemente, a NOEC).

Variáveis de medição: é qualquer tipo de variável que seja medida para permitir a determinação do ponto final do ensaio, utilizando uma ou mais do que uma variáveis de resposta. No presente método, o número de frondes, a superfície das frondes, o peso fresco e o peso seco são variáveis de resposta.

Monocultura: é uma cultura com uma única espécie de planta.

Necrose: é o tecido da fronde morto (ou seja, branco ou empapado em água).

Concentração sem efeitos observáveis (NOEC): é a concentração de ensaio imediatamente inferior à LOEC.

Fenótipo: são as características observáveis de um organismo, determinadas pela interacção dos seus genes com o ambiente em que vive.

Variáveis de resposta: são variáveis de estimação da toxicidade, derivadas de qualquer dos parâmetros medidos que descrevem a biomassa nos diferentes métodos de cálculo. No presente método, as taxas de crescimento e o rendimento são variáveis de resposta derivadas de variáveis de medição como o número de frondes, a superfície das frondes, o peso fresco ou o peso seco.

Ensaio semiestático (com renovação do meio): é um ensaio em que a solução de ensaio é periodicamente substituída, em determinados momentos do ensaio.

Ensaio estático: é um método de ensaio durante o qual não há renovação da solução de ensaio.

▼M1

Ponto final do ensaio: descreve, em termos gerais, o factor que será alterado pela substância química em estudo, por comparação com o controlo, cuja identificação é o objectivo do ensaio. No presente método, o ponto final é a inibição do crescimento, que pode ser expressa por diferentes variáveis de resposta, baseadas em uma ou mais variáveis de medição.

Meio de ensaio: é o meio sintético completo de crescimento em que as plantas de ensaio são cultivadas quando expostas à substância em estudo. A substância em estudo será normalmente dissolvida no meio de ensaio.

Rendimento: é o valor de uma variável de medição que exprime a biomassa no final do período de exposição menos o valor dessa variável de medição no início do período de exposição.

1.3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

Utilizando monoculturas de plantas do género *Lemna* em crescimento exponencial, são feitas culturas com diferentes concentrações da substância em estudo, durante sete dias. O objectivo do ensaio é quantificar os efeitos da substância em estudo sobre o crescimento vegetativo durante esse período, com base na avaliação de determinadas variáveis de medição. O número de frondes é a variável de medição primária. Pelo menos mais uma variável de medição (superfície total das frondes, peso seco ou peso fresco) será também medida, já que certas substâncias podem afectar outras variáveis de medição de forma muito mais severa do que o número de frondes. Para quantificar os efeitos relacionados com a substância em estudo, o crescimento das culturas de ensaio é comparado com o dos controlos, sendo determinada a concentração que causa uma inibição do crescimento de x % (p. ex.: 50 %), expressa como EC_x (p. ex.: EC_{50}).

O ponto final do ensaio é a inibição do crescimento, expresso como o aumento logarítmico da variável de medição (taxa média de crescimento específico) durante o período de exposição. A partir das taxas médias de crescimento específico registadas numa série de soluções de ensaio, a concentração que causa uma inibição da taxa de crescimento de x % (p. ex.: 50 %) é determinada e expressa como E_rC_x (nesse caso, E_rC_{50})

Outra variável de resposta utilizada no presente método de ensaio é o rendimento, que pode ser necessário para dar cumprimento a exigências regulamentares específicas de alguns países. O rendimento é definido como o valor da variável de medição no final do período de exposição menos o valor da variável de medição no início do período de exposição A partir dos rendimentos registados numa série de soluções de ensaio, a concentração que causa uma inibição do rendimento de x % (p. ex.: 50 %) é determinada e expressa como E_yC_x (nesse caso, E_yC_{50}).

Por outro lado, a menor concentração com efeito observável (LOEC) e a concentração sem efeitos observáveis (NOEC) podem ser determinadas estatisticamente.

1.4. INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

Deve existir um método analítico que apresente uma sensibilidade adequada para a quantificação da substância no meio de ensaio.

▼M1

A informação sobre a substância em estudo que poderá ser útil para estabelecer as condições do ensaio inclui a sua fórmula estrutural, pureza, hidrossolubilidade, estabilidade à luz e em água, pK_a, K_{ow}, pressão de vapor e biodegradabilidade. A hidrossolubilidade e a pressão de vapor podem ser utilizadas para calcular a constante da Lei de Henry, o que permitirá verificar a probabilidade de perdas significativas da substância em estudo durante o período de ensaio. Dessa forma, poderá avaliar-se se é necessário adoptar medidas específicas para o controlo dessas perdas. Nos casos em que a informação sobre a solubilidade e a estabilidade da substância de ensaio for incerta, recomenda-se que as mesmas sejam avaliadas nas condições de ensaio, ou seja, com o mesmo meio de crescimento, temperatura e regime de iluminação que irá ser utilizado no ensaio.

O controlo do pH do meio de ensaio é particularmente importante, nomeadamente no caso dos ensaios de metais ou de substâncias hidroliticamente instáveis, pelo que se recomenda, nesses casos, a adição de um tampão ao meio de crescimento (ver o primeiro parágrafo do ponto 1.7.4. Para mais orientações sobre o ensaio de substâncias cujas propriedades físico-químicas dificultam o ensaio, consultar a referência bibliográfica (11).

1.5. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Para verificação do procedimento de ensaio, pode(m) ser ensaiada(s) (uma) substância(s) de referência, como por exemplo o 3,5-diclorofenol, utilizado no ensaio de anel internacional (10). Será desejável proceder ao ensaio de uma substância de referência pelo menos duas vezes por ano ou, quando os ensaios forem realizados com menos frequência, em paralelo com a determinação da toxicidade das substâncias em estudo.

1.6. VALIDADE DO ENSAIO

Para que o ensaio seja válido, o tempo de duplicação do número de frondes no controlo deve ser inferior a 2,5 dias (60 horas), o que corresponde aproximadamente a uma multiplicação por sete em sete dias e a uma taxa média de crescimento específico de 0,275 d^{-1}. Utilizando os meios e as condições de ensaio descritas no presente método, esse critério pode ser cumprido num regime de ensaio estático (8). Parte-se igualmente do princípio de que esse critério poderá ser cumprido nos ensaios semiestáticos ou contínuos. O cálculo do tempo de duplicação é apresentado no ponto 2.1.

1.7. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.7.1. **Equipamento**

Todos os equipamentos que entrem em contacto com as soluções de ensaio devem ser totalmente construídos em vidro ou noutro material quimicamente inerte O material de vidro utilizado para as culturas e ensaios deve ser limpo de todos os contaminantes químicos que possam lixiviar para o meio de ensaio e esterilizado. Os frascos de ensaio devem ser suficientemente largos para que as frondes das diferentes colónias dos frascos de controlo possam crescer sem se sobreporem até ao final do ensaio. Não importa se as raízes tocarem o fundo dos frascos de ensaio, mas será aconselhável utilizar frascos com uma profundidade mínima de 20 mm e com um volume mínimo de 100 ml. A escolha do melhor tipo de frascos não é crítica, desde que esses requisitos sejam cumpridos. O ensaio já foi realizado com sucesso em frascos de vidro, caixas de cristalização ou caixas de Petri de dimensões apropriadas. Os frascos de ensaio devem ser cobertos de modo a minimizar a evaporação e a contaminação acidental, sem pôr em causa as necessárias trocas gasosas. Os frascos e, em especial, as tampas mais indicadas não provocarão zonas de sombra ou alterações das características do espectro luminoso.

▼M1

As culturas e os frascos de ensaio não devem ser conservados juntos. Para tal, o melhor será utilizar câmaras de crescimento, incubadoras ou mesmo salas separadas. A iluminação e a temperatura devem ser controláveis e mantidas a um nível constante (ver o ponto 1.7.8).

1.7.2. **Organismo de ensaio**

O presente ensaio pode ser realizado com *Lemna gibba* ou com *Lemna minor*. O apêndice 1 apresenta uma breve descrição das espécies de lentilha-de-água que já foram utilizadas para ensaios de toxicidade. O material vegetal pode ser obtido junto de uma colecção de culturas, de outro laboratório ou no campo. Quando forem recolhidas no campo, as plantas devem ser mantidas em cultura no mesmo meio que irá ser utilizado para o ensaio durante pelo menos oito semanas antes do mesmo. Os locais de colheita no campo onde se faz a recolha de culturas de arranque devem estar isentos de fontes evidentes de poluição. Caso sejam obtidas de outro laboratório ou de uma colecção de culturas, as plantas devem ser mantidas da mesma forma durante pelo menos três semanas. A fonte do material vegetal e da espécie ou clone (se conhecido) utilizado para o ensaio deve ser sempre indicada.

Devem ser utilizadas monoculturas visivelmente isentas de contaminação por outros organismos, como algas ou protozoários. As plantas saudáveis de *L. minor* são formadas por colónias com duas a cinco frondes, enquanto que as colónias saudáveis de *L. gibba* podem apresentar até sete frondes.

A qualidade e a uniformidade das plantas utilizadas para o ensaio terão uma influência significativa sobre o resultado do mesmo, pelo que as plantas devem ser cuidadosamente seleccionadas. Devem ser utilizadas plantas jovens, de crescimento rápido e sem lesões ou descoloração (clorose) visíveis. Uma cultura de boa qualidade é caracterizada por uma elevada incidência de colónias com pelo menos duas frondes. Um número elevado de frondes isoladas é indicativo de *stress* ambiental, nomeadamente por limitação de nutrientes, pelo que o material vegetal das culturas com essas características não deverá ser utilizado para os ensaios.

1.7.3. **Cultura**

Para reduzir a frequência das transferências para conservação da cultura (p. ex.: durante os períodos em que não estejam previstos ensaios com *Lemna*) as culturas poderão ser conservadas em ambiente escuro e a baixa temperatura (4-10 °C). O apêndice 2 apresenta mais informação sobre as técnicas de cultura. O surgimento de sinais evidentes de contaminação por algas ou por outros organismos exigirá a esterilização superficial de uma subamostra de frondes de *Lemna*, seguida de transferência para meio fresco (ver o apêndice 2). Nesse caso, a parte restante da cultura contaminada deverá ser descartada.

Pelo menos sete dias antes do ensaio, um número suficiente de colónias será transferido em condições assépticas para meio fresco esterilizado e cultivado durante 7-10 dias nas condições de ensaio.

1.7.4. **Meio de ensaio**

Existem diversos meios recomendados para as culturas de *Lemna minor* e *Lemna gibba*, como se descreve a seguir. A inclusão de um tampão de pH no meio de ensaio [MOPS (ácido 4-morfolinepropanosulfónico, N.º CAS: 1132-61-2; N.º EINECS: 214-478-5) no meio para *L. minor* ou $NaHCO_3$ no meio para *L. gibba*] deve ser cuidadosamente ponderada nos casos em que possa haver interacção com a substância em estudo que influencie a expressão da sua toxicidade. O meio de Steinberg (12) também poderá ser utilizado, desde que estejam cumpridos os critérios de validade do ensaio.

▼M1

Para as culturas e ensaios com *L. minor*, recomenda-se a utilização do meio Swedish Standard (SIS) para *Lemna*, modificado. A composição desse meio é dada no apêndice 3.

O meio de crescimento 20X — AAP, descrito no apêndice 3, é recomendado para as culturas e ensaios com *L. gibba*.

O meio de Steinberg, tal como descrito no apêndice 3, também é indicado para a *L. minor*, mas pode ser utilizado para a *L. gibba*, desde que estejam cumpridos os critérios de validade do ensaio.

1.7.5. **Soluções de ensaio**

As soluções de ensaio são geralmente preparadas através da diluição de soluções de reserva. As soluções de reserva da substância em estudo são normalmente preparadas por dissolução da substância em meio de crescimento.

A concentração mais elevada da substância em estudo no ensaio não deverá normalmente ser superior ao limite de solubilidade da substância em água, nas condições de ensaio. No entanto, cabe aqui notar que as *Lemna* spp. flutuam à superfície, podendo ser expostas a substâncias recolhidas na interface água-ar (p. ex.: substâncias de baixa hidrossolubilidade, hidrófobas ou tensioactivas). Nessas circunstâncias, terá lugar uma exposição a materiais diferentes dos que se encontram em solução e as concentrações de ensaio podem, dependendo das características da substância em estudo, ultrapassar o limite de hidrossolubilidade. Para as substância com baixa hidrossolubilidade, poderá ser necessário preparar uma solução de reserva concentrada ou dispersar a substância por meio de um dispersante ou solvente orgânico, de modo a facilitar a adição de quantidades exactas da substância em estudo ao meio de ensaio e a respectiva dispersão e dissolução. Devem ser desenvolvidos todos os esforços para evitar utilizar materiais desse tipo. A utilização de dispersantes ou de solventes auxiliares não deverá acarretar qualquer fitotoxicidade. Assim, por exemplo, os solventes mais comuns que não causam fitotoxicidade em concentrações até aos 100 $ml \cdot l^{-1}$ incluem a acetona e a dimetilformamida. Se for utilizado um dispersante ou um solvente, a sua concentração final, tão baixa quanto possível ($\leq$ 100 $ml \cdot l^{-1}$), deve ser comunicada e todos os frascos de exposição e de controlo devem ser expostos à mesma concentração. Para mais orientações sobre a utilização de dispersantes, consultar a referência bibliográfica (11).

1.7.6. **Grupos de ensaio e de controlo**

O conhecimento prévio da toxicidade da substância em estudo para a *Lemna*, por exemplo determinada com base nos resultados de ensaios de determinação da gama de concentrações, permitirá uma mais fácil escolha das concentrações a utilizar no ensaio. No ensaio de toxicidade definitivo, deverão normalmente ser estudadas cinco concentrações de ensaio, em progressão geométrica. De preferência, o factor de separação entre as concentrações de ensaio não deve ultrapassar os 3,2, mas poderá ser utilizado um valor mais elevado quando a curva de concentração-resposta for pouco pronunciada. Quando se utilizarem menos de cinco concentrações, deve ser apresentada uma justificação. Devem ser utilizados pelo menos três replicados de cada concentração de ensaio.

Para efeitos da definição da gama de concentrações (tanto nos ensaios de determinação da gama quanto nos ensaios definitivos de toxicidade) deve tomar-se em consideração os seguintes elementos:

▼M1

— Para a determinação do EC_x, as concentrações de ensaio devem abranger o valor de EC_x, de modo a garantir um nível de confiança apropriado. Assim, para a determinação do EC_{50}, por exemplo, a concentração de ensaio mais elevada deve ser superior ao valor de EC_{50}. Se o valor de EC_{50} se encontrar fora da gama de concentrações ensaiadas, os intervalos de confiança associados serão maiores, o que poderá impossibilitar o ajustamento de um modelo estatístico,

— Se o objectivo for a determinação do LOEC/NOEC, a concentração mais baixa ensaiada deve ser suficientemente baixa para que o seu crescimento não seja significativamente inferior ao dos controlos. Por outro lado, a concentração mais elevada a ensaiar deve ser suficientemente alta para que o seu crescimento seja significativamente inferior ao do controlo. Se não for esse o caso, o ensaio terá de ser repetido com uma gama de concentrações diferente (a não ser quando a concentração máxima já se encontre perto do limite de solubilidade ou da concentração máxima pretendida, 100 $mg \cdot l^{-1}$).

Todos os ensaios devem incluir controlos compostos pelo mesmo meio nutriente, número de frondes e de colónias e sujeitos às mesmas condições ambientais e procedimentos que os frascos de ensaio, mas sem adição da substância em estudo. Se for utilizado um dispersante ou solvente auxiliar, o ensaio deverá incluir um controlo suplementar, com a mesma concentração de solvente/dispersante que os frascos com a substância em estudo. O número de frascos com os replicados dos controlos (e de frascos com solvente, se aplicável) deve ser pelo menos igual e idealmente o dobro do número de frascos utilizados para cada concentração de ensaio.

Caso não seja necessário determinar o NOEC, o ensaio poderá ser alterado de modo a aumentar o número de concentrações estudadas, reduzindo o número de replicados por concentração. O número de replicados dos controlos deve, no entanto, ser de pelo menos três.

1.7.7. **Exposição**

As colónias, com 2 a 4 frondes visíveis, são transferidas da cultura de inóculo e distribuídas de forma aleatória pelos frascos de ensaio, em condições assépticas. Cada frasco de ensaio deve ser inoculado com um total de 9 a 12 frondes. O número de frondes e de colónias deve ser o mesmo em todos os frascos de ensaio. A experiência já obtida com o presente método e os dados dos ensaios de anel indicam que a utilização de três replicados de cada concentração em estudo, com 9 a 12 frondes em cada replicado, são suficientes para detectar diferenças de crescimento da ordem dos 4 a 7 %, para a inibição calculada a partir da taxa de crescimento (e dos 10 a 15 % a partir do rendimento), entre as diferentes concentrações (10).

A colocação aleatória dos frascos de ensaio na incubadora é necessária para reduzir ao mínimo a influência das diferenças espaciais em termos de intensidade da luz ou de temperatura. É igualmente necessário mudar a posição dos frascos, por blocos ou de forma aleatória, após as amostragens (ou mais frequentemente).

▼M1

Se um ensaio preliminar de estabilidade mostrar que a concentração da substância em estudo não pode ser mantida (ou seja, se a concentração medida diminuir mais de 80 % em relação à concentração inicial medida) durante o período de ensaio (7 dias), recomenda-se a utilização de um regime de ensaio semiestático. Nesse caso, as colónias devem ser expostas a soluções frescas de ensaio e de controlo em pelo menos duas ocasiões durante o ensaio (p. ex.: nos dias 3 e 5). A frequência da exposição ao meio fresco dependerá da estabilidade da substância em estudo; para manter concentrações quase constantes de substâncias altamente instáveis ou voláteis, poderá ser necessária uma frequência maior. Em certos casos, poderá ser necessário utilizar um procedimento em contínuo (11)(13).

A possibilidade de exposição através de aplicação foliar (aspersão) não está prevista no presente método de ensaio, para esse método ver a referência bibliográfica (14).

1.7.8. **Condições de incubação**

Deve ser utilizada uma iluminação fluorescente constante com luz branca, quente ou fria, de modo a proporcionar às culturas uma intensidade luminosa seleccionada na gama dos 85-135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, medida no comprimento de onda da fotossíntese (400-700 nm) em pontos que se encontrem à mesma distância da fonte luminosa que as frondes de *Lemna* (intensidade equivalente a 6 500-10 000 lux). As diferenças em relação à intensidade luminosa escolhida não devem ultrapassar, em toda a zona de ensaio, ± 15 %. O método de detecção e medição da luz e, em particular, o tipo de sensor utilizado, afectarão o valor medido. Os sensores esféricos (que respondem à luz proveniente de todos os ângulos acima e abaixo do plano de medição) e os sensores «de co-seno» (que respondem à luz proveniente de todos os ângulos acima do plano de medição) são preferíveis aos sensores unidireccionais e darão leituras mais elevadas para as fontes múltiplas de luz do tipo aqui descrito.

A temperatura dos frascos de ensaio deve ser mantida a 24 ± 2 °C. O pH do meio de controlo não deve aumentar mais de 1,5 unidades durante o ensaio. No entanto, um desvio superior a 1,5 unidades de pH não invalidará o ensaio quando se possa demonstrar que os critérios de validade são cumpridos. Em certos caos, contudo, como por exemplo nos ensaios de substâncias instáveis ou de metais, poderá ser necessário adoptar cuidados adicionais em relação à variação de pH. Para mais informações, consultar a referência bibliográfica (11).

1.7.9. **Duração**

O ensaio terminará 7 dias depois de as plantas terem sido transferidas para os frascos de ensaio.

1.7.10. **Medições e determinações analíticas**

No início do ensaio, o número de frondes em cada frasco de ensaio será registado, com o cuidado de contar todas as frondes evidentes e distintamente visíveis. O número de frondes que apresentam uma aparência normal e anormal deve ser determinado no início do ensaio e pelo menos mais uma vez a cada 3 dias durante o período de exposição (ou seja, pelo menos duas vezes ao longo dos 7 dias do ensaio) e no final do mesmo. Qualquer alteração observada no desenvolvimento das plantas, por exemplo no que respeita à dimensão e aparência das frondes, a indicações de necrose, clorose ou da formação de gibas, à desagregação ou perda de flutuabilidade das colónias ou à dimensão e aspecto das raízes, deverá ser registada. As características mais significativas do meio de ensaio (p. ex.: presença de materiais em suspensão, crescimento de algas nos frascos de ensaio) devem também ser registadas.

▼M1

Para além da determinação do número de frondes durante o ensaio, devem também ser avaliados os efeitos da substância em estudo sobre uma (ou mais) das seguintes variáveis de medição:

i) superfície total das frondes,

ii) peso seco,

iii) peso fresco.

A superfície total das frondes, enquanto variável, tem a vantagem de poder ser determinada para cada frasco de ensaio e de controlo no início, durante e no final do ensaio. O peso seco ou fresco deverá ser determinado no início do ensaio a partir de uma amostra da cultura de inóculo, representativa do inóculo utilizado para lançar o ensaio, e no final do mesmo, com o material retirado das plantas de cada frasco de ensaio e de controlo. Se a superfície das frondes não for medida, o seguimento do peso seco será preferível ao do peso fresco.

A superfície total das frondes, o peso seco e o peso fresco podem ser determinados do seguinte modo:

i) Superfície total das frondes: a superfície total das frondes de todas as colónias pode ser determinada por análise visual. Uma silhueta do frasco e das plantas de ensaio pode ser filmada com uma câmara de vídeo (p. ex.: colocando o frasco numa mesa de luz) e digitalizada. A partir de uma calibração utilizando formas planas com uma superfície conhecida, a superfície total das frondes em cada frasco de ensaio pode ser determinada. Deve ter-se o cuidado de excluir a interferência causada pela borda do frasco de ensaio. Uma abordagem alternativa, mais trabalhosa, será tirar uma fotografia dos frascos e plantas de ensaio, recortando depois a silhueta resultante das colónias e determinando a respectiva superfície utilizando um integrador ou papel milimétrico. Outras técnicas (p. ex.: a relação entre o peso da superfície de papel equivalente à silhueta das colónias e o peso de uma superfície de papel unitária) poderão igualmente revelar-se apropriadas;

ii) Peso seco: todas as colónias de cada frasco de ensaio são recolhidas e lavadas com água destilada ou desionizada. Retira-se a água em excesso e seca-se a 60 °C até obter um peso constante. Os fragmentos de raízes que se encontrem presentes também devem ser incluídos. O peso seco deverá ser expresso com uma precisão mínima de 0,1 mg;

iii) Peso fresco: as colónias são transferidas para tubos de plástico (ou de outro material inerte) de peso conhecido e com pequenos orifícios (1 mm) no fundo. Os tubos são depois centrifugados a 3 000 rpm durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Os tubos com as colónias, agora secas, voltam a ser pesados e o peso fresco é calculado por subtracção do peso dos tubos vazios.

1.7.10.1. *Frequência das medições e determinações analíticas*

Se se utilizar um método de ensaio estático, o pH de cada frasco de ensaio deve ser medido no início e no final do ensaio. No caso dos ensaios semiestáticos, deve ser medido o pH da solução de ensaio «fresca», antes da sua utilização, bem como o pH das correspondentes soluções «usadas».

▼M1

A intensidade luminosa deve ser medida, na câmara de crescimento, incubadora ou sala, em pontos que estejam à mesma distância da fonte de luz que as frondes de *Lemna*. A medição deverá ser efectuada pelo menos uma vez durante o ensaio. Deve ser registada diariamente a temperatura do meio contido num frasco especialmente destinado para esse efeito e mantido nas mesmas condições na câmara de crescimento, incubadora ou sala utilizada para o ensaio.

Durante o ensaio, as concentrações da substância em estudo deverão ser determinadas a intervalos regulares. Nos ensaios estáticos, a exigência mínima é que as concentrações sejam determinadas no início e no final do ensaio.

No caso dos ensaios semiestáticos em que não seja de esperar que a concentração da substância em estudo se mantenha no intervalo de ± 20 % da concentração nominal, será necessário analisar todas as soluções de ensaio no momento em que sejam preparadas e também imediatamente antes da respectiva utilização (ver o terceiro parágrafo do ponto 1.7.7). No entanto, para os ensaios em que a concentração inicial medida da substância em estudo não se encontra no intervalo de ± 20 % do valor nominal, mas em que se possam fornecer provas suficientes de que as concentrações iniciais são reprodutíveis e estáveis (isto é, se mantêm dentro da gama dos 80-120 % das concentrações iniciais), as determinações químicas poderão ser limitadas à maior e à menor concentração usadas no ensaio. Em qualquer dos casos, a determinação das concentrações da substância em estudo antes da sua utilização só é necessária num dos frascos replicados para cada concentração de ensaio (ou no conteúdo misturado de todos os frascos replicados).

Nos ensaios em contínuo, poderá ser utilizado um regime de amostragem semelhante ao descrito para os ensaios semiestáticos, com análises no início, no meio e no final do ensaio, sem que seja necessário, nesse caso, medir as concentrações nas soluções «usadas». Nesse tipo de ensaios, a taxa de diluição da mistura do diluente ou da solução de reserva com a substância em estudo deverá ser verificada diariamente.

Se existirem provas de que a concentração da substância de ensaio não variou mais de ± 20 %, durante o ensaio, em relação ao valor da concentração nominal ou da concentração inicial medida, a análise dos resultados poderá basear-se nos valores nominais ou iniciais medidos. Se a variação em relação à concentração nominal ou à concentração inicial medida for superior a ± 20 %, a análise dos resultados deverá basear-se na média geométrica da concentração durante a exposição ou em modelos que descrevam a diminuição da concentração da substância em estudo (11).

1.7.11. **Ensaio limite**

Em determinadas circunstâncias, ou seja, quando um ensaio preliminar indicar que a substância em estudo não apresenta efeitos tóxicos em concentrações até aos 100 mgl^{-1} ou até ao limite de solubilidade da substância no meio de ensaio (conforme a que seja menor), poderá proceder-se a um ensaio limite com comparação das respostas de um grupo de controlo e de um grupo exposto à substância em estudo (a uma concentração de 100 mgl^{-1} ou que corresponda ao limite de solubilidade da substância no meio de ensaio). É fortemente recomendado que a ausência de toxicidade seja confirmada por análise da concentração de exposição. Todas as condições de ensaio e critérios de validade anteriormente descritos são aplicáveis aos ensaios limite, com excepção da necessidade de utilizar o dobro do número de replicados dos frascos expostos à substância. O crescimento dos grupos de controlo e de exposição pode ser analisado através de um ensaio estatístico de comparação das médias, como por exemplo o teste t-Student.

▼M1

2. **RESULTADOS E RELATÓRIO**

2.1. TEMPO DE DUPLICAÇÃO

Para determinar o tempo de duplicação (T_d) do número de frondes e verificar se o ensaio cumpre o critério de validade correspondente (ponto 1.6), a seguinte fórmula deverá ser aplicada aos dados obtidos a partir dos frascos de controlo:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

onde μ é a taxa média de crescimento específico, determinada de acordo com o primeiro e segundo parágrafos do ponto 2.2.1.

2.2. VARIÁVEIS DE RESPOSTA

O objectivo do ensaio é determinar os efeitos da substância em estudo sobre o crescimento vegetativo da *Lemna*. O método de ensaio descreve duas variáveis de resposta, já que os Estados-Membros têm diferentes preferências e necessidades regulamentares. Para que os resultados dos ensaios possam ser aceitáveis em todos os Estados-Membros, os efeitos terão de ser avaliados utilizando ambas as variáveis de resposta, a) e b), a seguir descritas:

a) Taxa média de crescimento específico: esta variável é calculada com base no aumento logarítmico do número de frondes e, adicionalmente, na evolução logarítmica de outro parâmetro de medição (superfície total das frondes, peso seco ou peso fresco) em função do tempo (por dia), tanto nos frascos de controlo como nos grupos tratados com a substância em estudo. É por vezes designada por taxa de crescimento relativa (15);

b) Rendimento: esta variável de resposta é calculada com base no aumento do número de frondes e, adicionalmente, na evolução de outro parâmetro de medição (superfície total das frondes, peso seco ou peso fresco), tanto nos frascos de controlo como nos grupos tratados com a substância em estudo, até ao final do ensaio.

Cabe aqui notar que os valores de toxicidade calculados através destas duas variáveis de resposta não são comparáveis e que essa diferença tem de ser reconhecida para efeitos da utilização dos resultados do ensaio. Os valores de EC_x baseados na taxa média de crescimento específico (E_rC_x) serão geralmente mais elevados do que os resultados baseados no rendimento (E_yC_x), se forem seguidas as condições de ensaio apresentadas no presente método de ensaio, devido à base matemática das respectivas abordagens. Esse facto não deve ser interpretado como uma diferença de sensibilidade entre as duas variáveis de resposta, mas simplesmente como uma diferença matemática entre os valores. O conceito de taxa média de crescimento específico baseia-se no padrão geral de crescimento exponencial da lentilha-de-água em culturas não sujeitas a limitações, sendo a toxicidade estimada com base nos efeitos sobre a taxa de crescimento, e não depende do valor absoluto da taxa de crescimento específico dos controlos, do declive da curva de concentração-resposta ou da duração do ensaio. Em contraste, os resultados baseados no rendimento enquanto variável de resposta são dependentes de todas essas variáveis. O valor de E_yC_x é dependente da taxa de crescimento específico da espécie de lentilha-de-água utilizada em cada ensaio e da taxa máxima de crescimento específico, que pode ser diferente para as diferentes espécies ou mesmo para os diferentes clones. Esta variável de resposta não deve ser utilizada para comparar a sensibilidade das diferentes espécies ou mesmo dos diferentes clones de lentilha-de-água aos produtos tóxicos. Embora seja preferível, do ponto de vista científico, utilizar a taxa média de crescimento específico para a estimação da toxicidade, as estimativas da toxicidade com base no rendimento foram também incluídas no presente método de ensaio para satisfazer as actuais exigências regulamentares de alguns países.

▼M1

As estimativas da toxicidade deverão ser baseadas no número de frondes e numa variável de medição adicional (superfície total das frondes, peso seco ou peso fresco), já que certas substâncias poderão afectar outras variáveis de medição de forma muito mais severa do que o número de frondes. Esse efeito passará despercebido se o cálculo se basear exclusivamente no número de frondes.

O número de frondes, bem como o valor de qualquer outra variável de resposta medida, como a superfície total das frondes, o peso seco ou o peso fresco, será registado numa tabela, juntamente com as concentrações da substância em estudo em cada momento de medição. A subsequente análise dos dados, por exemplo para determinação do LOEC, do NOEC ou dos EC_x, deverá basear-se nos valores obtidos para cada replicado e não em médias calculadas para cada grupo exposto à substância em estudo.

2.2.1. **Taxa média de crescimento específico**

A taxa média de crescimento específico durante um determinado período é calculada como o aumento logarítmico das variáveis de crescimento — número de frondes e outra variável de medição (superfície total das frondes, peso seco ou peso fresco) — aplicando a fórmula a seguir apresentada aos valores obtidos para cada replicado dos controlos e dos frascos expostos à substância em estudo.

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - ln(N_i)}{t}$$

onde:

— μ_{i-j}: taxa média de crescimento específico entre o momento i e o momento j

— N_i: variável de medição no frasco de ensaio ou de controlo no momento i

— N_j: variável de medição no frasco de ensaio ou de controlo no momento j

— t: período decorrido entre i e j

Para cada um dos grupos de exposição e de controlo, calcular um valor médio da taxa de crescimento, associado às respectivas estimativas da variância.

A taxa média de crescimento específico deve ser calculada para a totalidade do período de ensaio (na fórmula acima, «i» é o momento inicial e «j» o momento final do ensaio). Para cada uma das concentrações de ensaio e de controlo, calcular o valor médio da taxa média de crescimento específico, associado às respectivas estimativas da variância. Por outro lado, a taxa de crescimento em cada secção do ensaio deve ser avaliada para verificar os efeitos da substância em estudo durante o período de exposição (p. ex.: através da análise das curvas de crescimento após transformação logarítmica). A existência de diferenças substanciais entre as taxas de crescimento de cada secção do ensaio e a taxa média de crescimento indica um desvio em relação à situação de crescimento exponencial constante, exigindo portanto uma análise mais pormenorizada das curvas de crescimento. Nesses casos, a abordagem mais cautelosa passa pela comparação entre as taxas de crescimento específico das culturas expostas durante o período de máxima inibição e as taxas observadas nos controlos durante o mesmo período.

▼M1

A percentagem de inibição da taxa de crescimento (I_r) poderá então ser calculada para cada concentração de ensaio (grupos expostos), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

onde:

— % I_r: percentagem de inibição da taxa média de crescimento específico

— μ_C: valor médio de μ nos controlos

— μ_T: valor médio de μ no grupo exposto

2.2.2. **Rendimento**

Os efeitos sobre o rendimento são determinados com base em duas variáveis de medição, o número de frondes e outra variável (superfície total das frondes, peso seco ou peso fresco), para cada frasco de ensaio, no início e no final do mesmo. No que respeita ao peso seco e ao peso fresco, a biomassa de partida é determinada com base numa amostra das frondes retirada da cultura utilizada para inocular os frascos de ensaio (ver o segundo parágrafo do ponto 1.7.3). Para cada uma das concentrações de ensaio e para os controlos, calcular um valor médio de rendimento, associado às respectivas estimativas da variância. A percentagem média de inibição do rendimento (% I_y) pode ser calculada, para cada grupo exposto, do seguinte modo:

$$\% I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

onde:

— % I_y: percentagem de redução do rendimento

— b_C: biomassa final menos biomassa inicial do grupo de controlo

— b_T: biomassa final menos biomassa inicial do grupo exposto

2.2.3. **Representação gráfica da curva de concentração-resposta**

Devem ser representadas as curvas de concentração-resposta, que relacionam a percentagem média de inibição da variável de resposta (I_r, ou I_y, calculadas como se indica no último parágrafo do ponto 2.2.1 ou no ponto 2.2.2) com o logaritmo da concentração da substância em estudo.

2.2.4. **Estimação do EC_x**

As estimativas do EC_x (p. ex.: EC_{50}) devem ser baseadas tanto na taxa média de crescimento específico (E_rC_x) como no rendimento (E_yC_x), devendo cada uma dessas medidas ser, por seu lado, baseada no número de frondes e numa variável de medição adicional (superfície total das frondes, peso seco ou peso fresco), já que certas substâncias afectam de forma diferente o número de frondes e outras variáveis de medição. Os parâmetros de toxicidade pretendidos são, portanto, quatro valores de EC_x para cada um dos níveis de inibição x calculados: E_rC_x (número de frondes); E_rC_x (superfície total das frondes, peso seco ou peso fresco); E_yC_x (número de frondes); e E_yC_x (superfície total das frondes, peso seco ou peso fresco).

▼M1

2.3. PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

O objectivo é descrever de forma quantitativa, por análise de regressão, a relação concentração-resposta. Pode utilizar-se uma regressão linear ponderada, antecedida de uma transformação de linearização dos dados de resposta — por exemplo para unidades *probit*, *logit* ou de Weibull (16) –, mas a técnica preferida é a aplicação de procedimentos de regressão não linear, que permitem lidar melhor com as inevitáveis irregularidades dos dados e com os desvios em relação a uma boa distribuição. Nas zonas próximas da inibição nula ou total, essas irregularidades podem mesmo ser aumentadas pela transformação, o que irá interferir com a análise (16). Cabe aqui notar que os métodos padrão de análise que utilizam os transformados *probit*, *logit* ou de Weibull se destinam à análise de dados quantais (p. ex.: mortalidade ou sobrevivência), pelo que terão de ser alterados para lidar com os dados relativos à taxa de crescimento ou ao rendimento. Alguns métodos para a determinação dos valores de EC_x a partir de dados contínuos podem ser consultados em (17), (18) e (19).

Para cada uma das variáveis de resposta em análise, utilizar a relação concentração-resposta para estimar os valores pontuais de EC_x. Sempre que possível, deverão ser determinados os limites de confiança a 95 % para cada estimativa. A adequação do ajustamento da curva estimada pelo modelo de regressão aos dados de resposta deve ser avaliada, graficamente ou por métodos estatísticos. A análise de regressão deve ser efectuada utilizando os valores de cada replicado e não o valor médio para cada grupo exposto.

As estimativas do EC_{50} e os respectivos intervalos de confiança podem também ser obtidos utilizando uma interpolação linear com *bootstrapping* (20), quando os métodos/modelos de regressão disponíveis não forem aplicáveis aos dados existentes.

Para a estimação do LOEC e, portanto, do NOEC, será necessário comparar as médias dos frascos expostos utilizando técnicas de análise da variância (ANOVA). A média para cada concentração deve então ser comparada com a média observada nos controlos, utilizando um método apropriado de comparação múltipla ou de análise das tendências. Os testes de Dunnett ou de Williams (21)(22)(23)(24) poderão ser úteis para esse efeito. É necessário verificar se o pressuposto de homogeneidade da variância das análises ANOVA é cumprido. Essa verificação poderá ser realizada graficamente ou através de um teste formal (25). Para tal, podem utilizar-se os testes de Levene ou de Bartlett. O problema do não cumprimento do pressuposto de homogeneidade das variâncias pode por vezes ser corrigido através da transformação logarítmica dos dados. Caso a heterogeneidade das variâncias seja extrema e não possa ser corrigida por transformação, deverá ser considerada a possibilidade de utilização de métodos de análise das tendências como, por exemplo, o método degressivo de Jonkheere. Para mais orientações sobre a determinação do NOEC, consultar a referência (19).

Os mais recentes desenvolvimentos científicos conduziram à recomendação de que fosse abandonado o conceito de NOEC, que deverá ser substituído pela estimação dos valores de EC_x por regressão. No caso do presente ensaio com *Lemna*, não foi definido nenhum valor ideal para o x. No entanto, a gama entre 10-20 % parece ser apropriada (dependendo da variável de resposta escolhida), devendo ser comunicados, de preferência, tanto os valores de EC_{10} como de EC_{20}.

3. RELATÓRIOS

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir a seguinte informação:

Substância de ensaio:

— natureza física e propriedades físico-químicas, incluindo o limite de hidrossolubilidade,

▼M1

— dados de identificação química (p. ex.: Número CAS), incluindo a respectiva pureza.

Espécie de ensaio:

— nome científico, clone (se for conhecido) e fonte.

Condições de ensaio:

— procedimento de ensaio utilizado (estático, semiestático ou contínuo),

— data de início do ensaio e respectiva duração,

— meio de ensaio,

— descrição do método experimental: frascos e tampas utilizados no ensaio, volumes das soluções, número de colónias e de frondes em cada frasco de ensaio, no início do mesmo,

— concentrações de ensaio (nominais ou medidas, conforme apropriado) e número de replicados por concentração,

— métodos de preparação das soluções de reserva e de ensaio, incluindo a eventual utilização de solventes ou dispersantes,

— temperatura durante o ensaio,

— fonte luminosa, intensidade e homogeneidade da luz,

— valores de pH dos meios de controlo e de ensaio,

— concentrações da substância em estudo e respectivo método de análise, juntamente com os dados apropriados para a avaliação da qualidade do método (estudos de validação, desvios-padrão ou limites de confiança das análises),

— métodos utilizados para a determinação do número de frondes ou de outras variáveis de medição, como o peso seco, o peso fresco ou a superfície das frondes,

— todos os desvios em relação ao presente método de ensaio.

Resultados:

— dados brutos: número de frondes e outras variáveis de medição em cada frasco de ensaio e de controlo, para cada momento de amostragem, e momento de realização da análise,

— médias e desvios-padrão para cada variável de medição,

— curvas de crescimento para cada concentração (recomenda-se a transformação logarítmica da variável de medição, ver o segundo parágrafo do ponto 2.2.1,

— tempo de duplicação/taxa de crescimento dos controlos, com base no número de frondes,

— variáveis de resposta calculadas para cada replicado exposto, com os respectivos valores médios, e coeficiente de variação dos replicados,

— representação gráfica da relação concentração/efeito,

— estimativas dos pontos finais de toxicidade para as variáveis de resposta, p. ex.: EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, e os intervalos de confiança associados. Quando forem calculados, valores do LOEC e/ou do NOEC e métodos estatísticos utilizados para a respectiva determinação,

▼M1

— caso tenha sido utilizada uma análise ANOVA, limite de detecção do efeito (p. ex.: diferenças menos significativas),

— ocorrência de estimulação do crescimento que tenha sido verificada em qualquer dos grupos expostos,

— sinais visuais de fitotoxicidade, bem como quaisquer observações em relação às soluções de ensaio,

— discussão dos resultados, incluindo qualquer influência sobre os resultado do ensaio que seja decorrente das alterações efectuadas em relação ao presente método de ensaio.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD TG 221 (2006) Lemna spp. Growth Inhibition Test

(2) Recurso a estudos com *Lemna* para substâncias coradas é descrito na secção 13.5.3 do *EU Manual of Decisions*, de Julho de 2006, disponível no endereço: http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals

(3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment — Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, disponível no endereço:

http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1234958685#A

(4) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA

(5) USEPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8 pp

(6) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 pp

(7) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 pp. (em sueco)

(8) Environment Canada (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37-120 pp

(9) Environment Canada (1993). Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series N.º 145

(10) Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999). The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency

(11) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. OCDE Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N.º 23

(12) ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test

▼**M1**

(13) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor L.).* Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA--600/3-77 108. Setembro de 1977

(14) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, 353-359

(15) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 481-483

(16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718

(17) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167

(18) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 1485-1494

(19) OCDE (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data

(20) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN

(21) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121

(22) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491

(23) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117

(24) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531

(25) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose--responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96

▼M1

Apêndice 1

Descrição de *Lemna* spp.

A planta aquática que tem o nome comum de lentilha-de-água, *Lemna* spp., pertence à Família *Lemnaceae*, composta por quatro Géneros com espécies distribuídas por todo o mundo. As suas diferentes formas e taxonomia já se encontram descritas de forma exaustiva (1)(2). A *Lemna gibba* e a *Lemna minor* são espécies representativas das zonas temperadas, muito utilizadas em ensaios de toxicidade. Ambas as espécies apresentam um caule discóide (fronde), flutuante ou submerso, e uma raiz muito fina que parte do centro da face inferior de cada fronde. As *Lemna* spp. raramente produzem flores, sendo a reprodução garantida pela produção vegetativa de novas frondes (3). Em comparação com as plantas mais velhas, as plantas jovens tendem a ser mais claras, com raízes mais curtas e são constituídas por duas ou três frondes de tamanhos diferentes. O pequeno tamanho, a estrutura simples, a reprodução assexuada e o tempo de duplicação curto das *Lemna* fazem com que estas plantas sejam muito utilizadas em ensaios de laboratório (4)(5).

Devido a variações de sensibilidade, provavelmente interespecíficas, só são válidas as comparações de sensibilidade para uma mesma espécie.

Exemplos de espécies de *Lemna* que já foram utilizadas em ensaios laboratoriais: referências das espécies

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8 pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 pp. (em sueco).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8 pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481-483.

▼**M1**

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Fontes para obtenção de plantas de *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, CANADÁ, M5S 3 B2
Tel: +1-416-978-3641
Fax:+1-416-978-5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca
http://www.botany.utoronto.ca/utcc

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
EUA
phone 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91 STOCKHOLM
SUÉCIA
Tel: +46 8 674 7240
Fax +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
ALEMANHA
e-mail: lemna@uba.de
http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

Bibliografia

(1) Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22

▼**M1**

Apêndice 2

Conservação das culturas de reserva

As culturas de reserva podem ser conservadas a baixa temperatura (4-10 °C) por longos períodos, sem que seja necessário proceder à sua transferência periódica. O meio de crescimento da *Lemna* pode ser o mesmo que é utilizado para os ensaios, mas as culturas de reserva também podem ser conservadas noutros meios nutrientes enriquecidos.

Periodicamente, um certo número de plantas jovens, verdes claras, são removidas e novamente cultivadas, através de uma técnica asséptica, em frascos com meio fresco. Nas condições de baixa temperatura aqui sugeridas, a transferência das culturas pode ser realizada a intervalos que poderão ir até aos três meses.

Devem utilizar-se frascos de cultura quimicamente limpos (lavados com ácido) e estéreis e técnicas de manuseamento em condições de assepsia. Caso se verifique uma contaminação da cultura de reserve, por exemplo por outras algas ou por um fungo, será necessário adoptar medidas para eliminar os organismos contaminantes. No caso das algas e da maior parte dos restantes organismos contaminantes, isso será possível por esterilização superficial. Retira-se uma amostra da planta contaminada e cortam-se as raízes. O material é depois vigorosamente agitado em água limpa, sendo depois mergulhado numa solução a 0,5 % (v/v) de hipoclorito de sódio durante um período de 30 segundos a 5 minutos. O material vegetal é depois lavado com água esterilizada e transferido para uma série de frascos de cultura com meio de crescimento fresco. Muitas frondes acabarão por morrer como resultado deste tratamento, principalmente quando os períodos de exposição utilizados forem mais longos, mas algumas delas sobreviverão e ficarão normalmente isentas de qualquer contaminação. As frondes sobreviventes podem ser utilizadas para reinocular novas culturas.

▼M1

Apêndice 3

Meios

Existem diversos meios de crescimento recomendados para *L. minor* e *L. gibba*. Para a *L. minor*, o meio recomendado é o meio Swedish Standard (SIS) modificado, enquanto que para *L. gibba* o meio recomendado é o meio 20X AAP. A composição de ambos os meios é apresentada a seguir. Para a preparação destes meios, devem utilizar-se reagentes e produtos químicos de qualidade analítica e água desionizada.

Meio de crescimento Swedish Standard (SIS) para *Lemna*

— As soluções de reserva I-V são esterilizadas em autoclave (120 °C, 15 minutos) ou por filtração através de membrana (aproximadamente 0,2 μm de diâmetro de poro),

— As soluções VI e (opcionalmente) VII são esterilizadas exclusivamente por filtração através de membrana; estas soluções não devem ser esterilizadas em autoclave,

— As soluções de reserva esterilizadas devem ser armazenadas em local fresco e ao abrigo da luz. As soluções I-V devem ser descartadas ao fim de seis meses, enquanto que a solução VI (e, opcionalmente, também a VII) têm um período de conservação de um mês,

N.º da solução de reserva	Substância	Concentração na solução de reserva ($g \cdot l^{-1}$)	Concentração no meio preparado ($g \cdot l^{-1}$)	Meio preparado	
				Elemento	Concentração ($mg \cdot l^{-1}$)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2.4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4.7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4.5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3.6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA·$2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (tampão)	490	490	—	—

— Para preparar um litro de meio SIS, adicionar os seguintes elementos a 900 ml de água desionizada:

— 10 ml da solução de reserva I,

— 5 ml da solução de reserva II,

— 5 ml da solução de reserva III,

— 5 ml da solução de reserva IV,

▼M1

— 1 ml da solução de reserva V,

— 5 ml da solução de reserva VI,

— 1 ml da solução de reserva VII (opcional),

Nota: A solução de reserva VII (tampão MOPS) poderá ser necessária para o estudo de determinadas substâncias (ver o último parágrafo do ponto 1.4).

— Ajustar o pH a 6,5 ± 0,2 com HCl ou NaOH 0,1 N ou 1,0 N, completando o volume até 1 l com água desionizada.

Meio de crescimento 20X–AAP

As soluções de reserva são preparadas com água esterilizada ou desionizada.

As soluções de reserva esterilizadas devem ser armazenadas em local fresco e ao abrigo da luz. Nessas condições, terão um tempo de conservação mínimo de 6-8 semanas.

Para o meio 20X–AAP, prepara-se cinco soluções de reserva de nutrientes (A1, A2, A3, B e C), utilizando produtos químicos de qualidade analítica. Para produzir o meio de crescimento, adicionar 20 ml de cada solução de reserva de nutrientes a cerca de 850 ml de água desionizada. Ajustar o pH a 7,5 ± 0,1 com HCl ou NaOH 0,1 N ou 1,0 N, completando o volume até 1 l com água desionizada. Filtrar o meio assim obtido por uma membrana com diâmetro de poro de (aproximadamente) 0,2 µm para um recipiente esterilizado.

O meio de crescimento para os ensaios deve ser preparado com 1-2 dias de antecedência, de modo a permitir a estabilização do pH. O pH do meio de crescimento deve ser verificado antes da sua utilização e, se necessário, reajustado com HCl ou NaOH 0,1 N ou 1,0 N, como se descreve acima.

N.º da solução de reserva	Substância	Concentração na solução de reserva ($g \cdot l^{-1}$) (*)	Concentração no meio preparado ($g \cdot l^{-1}$) (*)	Meio preparado	
				Elemento	Concentração ($mg \cdot l^{-1}$) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2.2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4.7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4;3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2.4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3.6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 $mg \cdot l^{-1}$	66 $\mu g \cdot l^{-1}$	Zn	31 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 $mg \cdot l^{-1}$	29 $\mu g \cdot l^{-1}$	Co	7,1 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	7,3 $mg \cdot l^{-1}$	145 $\mu g \cdot l^{-1}$	Mo	58 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 $mg \cdot l^{-1}$	0,24 $\mu g \cdot l^{-1}$	Cu	0,080 $\mu g \cdot l^{-1}$
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Excepto nos casos assinalados

▼M1

Nota: A concentração final teoricamente ideal de bicarbonato (que evita qualquer variação significativa do pH) é de 15 mg/l e não de 300 mg/l. No entanto, a utilização habitual do meio 20X–AAP, nomeadamente no ensaio de anel para o presente método, baseia-se numa concentração de 300 mg/l [I. Sims, P. Whitehouse e R. Lacey. (1999)]. The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

Meio de STEINBERG (derivado do método ISO 20079)

Concentrações e soluções de reserva

— O meio de Steinberg modificado é utilizado no método ISSO 20079 apenas para a *Lemna minor* (já que o método só utiliza essa espécie) mas o ensaio mostrou bons resultados também com *Lemna gibba*.

— Para a preparação do meio, deve utilizar-se reagentes e produtos químicos de qualidade analítica e água desionizada.

— Preparar o meio nutriente a partir das soluções de reserva ou do meio 10 vezes mais concentrado, que é a máxima concentração que se pode obter sem que ocorra precipitação.

Quadro 1

Meio de Steinberg com pH estabilizado (modificado segundo Altenburger)

Substância		Meio nutriente	
Macroelementos	peso molecular	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4.7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Microelementos	peso molecular	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4.7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4.2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2.4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3.6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA disódico bi-hidratado	372,24	1 500,00	4,03

▼M1

Quadro 2

Soluções de reserva (Macroelementos)

1. **Macroelementos (50 vezes mais concentrados)**	g/l
Solução de reserva 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Solução de reserva 2:	
$MgSO_4.7H_2O$	5,00
Solução de reserva 3:	
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	14,75

Quadro 3

Soluções de reserva (Microelementos)

2. **Microelementos (1 000 vezes mais concentrados)**	mg/l
Solução de reserva 4:	
H_3BO_3	120,0
Solução de reserva 5:	
$ZnSO_4.7H_2O$	180,0
Solução de reserva 6:	
$Na_2MoO_4.2H_2O$	44,0
Solução de reserva 7:	
$MnCl_2.4H_2O$	180,0
Solução de reserva 8:	
$FeCl_3.6H_2O$	760,00
EDTA dissódico bi-hidratado	1 500,00

— As soluções de reserva 2 e 3 e, em separado, 4 a 7, podem ser misturadas (tomando em conta as concentrações pretendidas).

— Para aumentar o período de conservação, tratar as soluções em autoclave a 121 °C durante 20 min ou, em alternativa, esterilizar por filtração através de membrana (0,2 μm). Para a solução de reserva 8, é fortemente recomendada a esterilização por filtração (0,2 μm).

Preparação da concentração final do meio de STEINBERG (modificado)

— Juntar 20 ml das soluções de reserva 1, 2 e 3 (ver o quadro 2) a cerca de 900 ml de água desionizada, para evitar a precipitação.

— Juntar 1,0 ml das soluções de reserva 4, 5, 6, 7 e 8 (ver o quadro 3).

— O pH deverá ser de 5,5 ± 0,2 (ajustar por adição de um volume tão pequeno quanto possível de solução de NaOH ou de HCl).

▼M1

— Completar com água até 1 000 ml.

— Se as soluções de reserva tiverem sido esterilizadas e se se utilizar uma água apropriada, não é necessário proceder a mais nenhuma esterilização. Se o meio final for esterilizado, a solução de reserva 8 deve ser acrescentada depois do tratamento em autoclave (a 121 °C durante 20 min).

Preparação do meio de STEINBERG (modificado) 10 vezes concentrado, para armazenamento temporário

— Juntar 20 ml das soluções de reserva 1, 2 e 3 (ver o quadro 2) a cerca de 30 ml de água para evitar a precipitação.

— Juntar 1,0 ml das soluções de reserva 4, 5, 6, 7 e 8 (ver o quadro 3). Completar com água até 100 ml.

— Se as soluções de reserva tiverem sido esterilizadas e se utilizar uma água apropriada, não é necessário proceder a mais nenhuma esterilização. Se o meio final for esterilizado, a solução de reserva 8 deve ser acrescentada depois do tratamento em autoclave (a 121 °C durante 20 min).

— O pH do meio (concentração final) deverá ser de 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27. ENSAIO DE TOXICIDADE EM QUIRONOMÍDEOS NUM SISTEMA SEDIMENTOS-ÁGUA COM SEDIMENTOS ENRIQUECIDOS

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 218 da OCDE (2004). Foi concebido para avaliar os efeitos nas larvas dos dípteros de água doce *Chironomus* sp., que vivem nos sedimentos, de uma exposição prolongada a determinados produtos químicos. Baseia-se nos atuais protocolos de ensaios de toxicidade para as espécies *Chironomus riparius* e *Chironomus tentans* que foram desenvolvidos na Europa (1)(2)(3) e na América do Norte (4)(5)(6)(7)(8) e foram sujeitos a um ensaio interlaboratorial (1)(6)(9). Pode também utilizar-se outras espécies de quironomídeos bem documentadas, como a *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. O cenário de exposição utilizado neste método de ensaio passa pelo enriquecimento dos sedimentos na substância em estudo. A seleção do cenário de exposição adequado depende da finalidade do ensaio. A adição da substância em estudo aos sedimentos tem por objetivo simular a acumulação de produtos químicos persistentes nos sedimentos. Este sistema de exposição utiliza um sistema de ensaio sedimentos-água no qual os sedimentos foram enriquecidos no produto químico em estudo.

3. As substâncias a ensaiar com organismos que vivem nos sedimentos persistem, em geral, neste compartimento durante longos períodos. A exposição dos referidos organismos pode ter lugar por várias vias. A importância relativa de cada via de exposição, bem como o tempo de contribuição de cada uma delas para os efeitos tóxicos globais, depende das propriedades físico-químicas do produto químico em causa. No caso de substâncias fortemente adsorventes (por exemplo, com log K_{ow} > 5) ou de substâncias ligadas aos sedimentos por ligações covalentes, a ingestão de alimentos contaminados pode constituir uma via de exposição significativa. Para não subestimar a toxicidade das substâncias altamente lipófilas, pode ponderar-se a utilização de alimentos adicionados aos sedimentos antes da aplicação da substância em estudo. De forma a ter em conta todas as vias de exposição potenciais, o presente método de ensaio focaliza-se na exposição a longo prazo. A duração do ensaio é de 20 a 28 dias para *C. riparius* e *C. yoshimatsui* e de 28 a 65 dias para *C. tentans*. Se forem necessários dados a curto prazo para uma finalidade específica (por exemplo, para investigar os efeitos de um produto químico), é possível utilizar replicados adicionais, a remover após dez dias.

4. Os parâmetros medidos são o número total de indivíduos adultos emergidos e o tempo necessário para tal. Se forem necessários dados adicionais a curto prazo, recomenda-se que as determinações da sobrevivência e do crescimento das larvas apenas sejam efetuadas após um período de dez dias, recorrendo aos replicados adicionais que se justifiquem.

5. Recomenda-se a utilização de sedimentos formulados. Estes apresentam várias vantagens relativamente aos sedimentos naturais:

   — a variabilidade experimental é reduzida porque os sedimentos constituem uma matriz "normalizada" reprodutível, eliminando-se a necessidade de encontrar fontes de sedimentos limpos e não contaminados,

   — os ensaios podem ser iniciados em qualquer momento, eliminando-se assim a variabilidade sazonal dos sedimentos ensaiados, não havendo necessidade de pré-tratar os sedimentos para remover a fauna indígena; a utilização de sedimentos formulados reduz também o custo associado à colheita no terreno de quantidades suficientes de sedimentos para os ensaios de rotina,

   — a utilização de sedimentos formulados permite ainda efetuar comparações de toxicidade e classificar as substâncias em conformidade.

6. Definem-se no apêndice 1 alguns conceitos utilizados.

▼M4

PRINCÍPIO DO MÉTODO

7. São expostas larvas de quironomídeos do primeiro estádio larvar a uma gama de concentrações do produto químico em estudo em sistemas sedimentos-água. Os sedimentos são enriquecidos na substância em estudo, sendo as larvas do primeiro estádio larvar subsequentemente introduzidas em copos de ensaio nos quais as concentrações de sedimentos e da água foram estabilizadas. A emergência de quironomídeos e as respetivas taxas de desenvolvimento são medidas no final do ensaio. Se necessário, a sobrevivência e o peso das larvas podem também ser determinados decorridos 10 dias, utilizando os replicados adicionais que se justifiquem. Os dados são analisados por recurso a um modelo de regressão, de forma a estimar a concentração que causaria uma redução de x% na emergência, na sobrevivência ou no crescimento das larvas (por exemplo, CE_{15}, CE_{50}, etc.), ou utilizando hipóteses estatísticas, para determinar o NOEC/LOEC. Este último método exige a comparação de valores que produzem efeitos com valores de controlo, por recurso a testes estatísticos.

INFORMAÇÕES SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

8. Devem ser conhecidas a solubilidade em água e a pressão de vapor da substância em estudo, bem como a partição nos sedimentos medida ou calculada e a estabilidade na água e nos sedimentos. Para a quantificação da substância em estudo na água sobrenadante, na água dos poros e nos sedimentos, deve dispor-se de um método analítico fiável, com exatidão e limite de deteção conhecidos e documentados. A fórmula estrutural e o grau de pureza da substância constituem igualmente informações úteis. O comportamento químico da substância em estudo (p. ex.: dissipação, degradação abiótica ou biótica, etc.) é também uma informação importante. Para mais orientações sobre o ensaio de substâncias cujas propriedades físico-químicas dificultam a realização dos ensaios, consultar a referência bibliográfica (12).

PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA

9. Pode testar-se periodicamente produtos químicos de referência com o objetivo de garantir a fiabilidade do protocolo e das condições de ensaio. As seguintes substâncias constituem exemplos de substâncias tóxicas de referência utilizadas com êxito em ensaios interlaboratoriais e em estudos de validação: lindano, trifluralina, pentaclorofenol, cloreto de cádmio e cloreto de potássio (1)(2)(5)(6)(13).

VALIDADE DO ENSAIO

10. Um ensaio é considerado válido se forem cumpridas as seguintes condições:

— a emergência nos controlos deve ser de, pelo menos, 70 % no final do ensaio (1)(6),

— a emergência de indivíduos adultos das espécies *C. riparius* e *C. yoshimatsui* nos recipientes de controlo deve ocorrer 12 a 23 dias após a inserção destas espécies nos recipientes; no caso da *C. tentans*, é necessário um período de 20 a 65 dias,

— no final do ensaio, devem determinar-se o pH e a concentração de oxigénio dissolvido em cada recipiente. A concentração de oxigénio deve ser de, pelo menos, 60 % do valor da saturação com ar (VSA) à temperatura utilizada e o pH da água sobrenadante deve estar compreendido entre 6 e 9, em todos os recipientes de ensaio,

— a temperatura da água não deve variar mais de ± 1,0 °C. Esta temperatura pode ser controlada numa sala isotérmica, caso em que a temperatura ambiente deve ser confirmada a intervalos adequados.

▼M4

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Recipientes de ensaio

11. O estudo é realizado em copos de vidro de 600 ml, com 8 cm de diâmetro. Pode utilizar-se outros recipientes, devendo contudo assegurar-se uma espessura adequada da água sobrenadante e dos sedimentos. A superfície dos sedimentos deve proporcionar 2 a 3 cm^2 por cada larva. O rácio entre a espessura da camada de sedimentos e a espessura da água sobrenadante deve ser de 1:4. Os recipientes de ensaio e o restante equipamento que entre em contacto com o sistema de ensaio devem ser exclusivamente de vidro ou de outro material quimicamente inerte (p. ex. Teflon).

Seleção das espécies

12. A espécie a utilizar de preferência no ensaio é a *Chironomus riparius*. A espécie *Chironomus tentans* também é adequada, mas é mais difícil de manipular e exige um período de ensaio mais longo. Pode igualmente utilizar-se a *Chironomus yohimatsui*. O apêndice 2 apresenta informações sobre os métodos de cultura de *Chironomus riparius*. Estão também disponíveis informações sobre as condições de cultura das espécies *Chironomus tentans* (4) e *Chironomus yoshimatsui* (11). A identidade das espécies deve ser confirmada antes do ensaio, exceto no caso de organismos provenientes de uma cultura interna do laboratório.

Sedimentos

13. Devem ser utilizados, de preferência, sedimentos formulados (também chamados sedimentos reconstituídos, artificiais ou sintéticos). Contudo, se forem utilizados sedimentos naturais, estes devem ser caracterizados (pelo menos pH e teor de carbono orgânico, recomendando-se a determinação de outros parâmetros, tais como a razão C/N e a granulometria) e devem estar isentos de qualquer contaminação e de outros organismos que possam competir com os quironomídeos ou consumi-los. Recomenda-se igualmente que, antes de ser utilizados num ensaio de toxicidade em quironomídeos, os sedimentos naturais sejam acondicionados durante sete dias em condições semelhantes às do ensaio subsequente. Recomenda-se que sejam utilizados no presente ensaio (1)(15)(16) sedimentos formulados com a seguinte composição, baseada na do solo artificial utilizado no método C.8 (14):

a) 4-5 % (massa seca) de turfa: pH tão próximo quanto possível do intervalo 5,5-6,0; é importante utilizar turfa em pó, finamente moída (granulometria das partículas ≤ 1 mm), unicamente seca ao ar;

b) 20 % (massa seca) de argila caulinítica, de preferência com teor de caulinite superior a 30 %;

c) 75-76 % (massa seca) de areia quartzítica, com predominância de areia fina com mais de 50 % de partículas de granulometria compreendida entre 50 e 200 μm;

d) A quantidade de água desionizada necessária para que o teor de humidade da mistura final se situe na gama 30-50 %;

e) A quantidade de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) quimicamente puro necessária para ajustar o pH da mistura final dos sedimentos a 7,0 ± 0,5. O teor de carbono orgânico da mistura final deve ser de 2 % ± 0,5 %, devendo ser ajustado por recurso a quantidades adequadas de turfa e areia, em conformidade com as alíneas a) e c).

14. As origens da turfa, da argila caulinítica e da areia devem ser conhecidas. Deve verificar-se a ausência de contaminação química (p. ex., metais pesados, compostos organoclorados, compostos organofosforados, etc.) nos componentes dos sedimentos. No apêndice 3, apresenta-se um exemplo de preparação de sedimentos formulados. Uma mistura de componentes secos também é aceitável caso se demonstre que, após a adição da água sobrenadante, não ocorre separação de componentes dos sedimentos (por exemplo, partículas de turfa flutuantes) e que a turfa ou os sedimentos estão suficientemente acondicionados.

▼M4

Água

15. Qualquer água com as características químicas de uma água de diluição aceitável enunciadas nos apêndices 2 e 4 é adequada para o ensaio. Para a cultura e o ensaio, pode utilizar-se qualquer água adequada, água natural (superficial ou subterrânea), água reconstituída (ver o apêndice 2) ou água da rede de abastecimento desclorada, desde que os quironomídeos nela sobrevivam durante todo o período de cultura e de ensaio sem evidenciarem sinais de *stress*. No início do ensaio, o pH da água de ensaio deve estar compreendido entre 6 e 9 e a dureza total da água, expressa em $CaCO_3$, não deve exceder 400 mg/l. No entanto, caso se suspeite de uma interação entre os iões responsáveis pela dureza e a substância em estudo, deve utilizar-se uma água de dureza inferior (nessa eventualidade, o meio Elendt M4 não pode ser utilizado). Deve utilizar-se o mesmo tipo de água em todo o estudo. As características de qualidade da água enumeradas no apêndice 4 devem ser determinadas pelo menos duas vezes por ano, ou sempre que se suspeite que tenham mudado significativamente.

Soluções-mãe — sedimentos enriquecidos

16. O enriquecimento dos sedimentos na concentração escolhida é geralmente efetuado por adição direta de uma solução da substância em estudo. Com o auxílio de um moinho de rolos ou de um misturador de alimentos, ou manualmente, adiciona-se aos sedimentos formulados uma solução-mãe da substância em estudo, dissolvida em água desionizada. Se a substância for pouco solúvel em água, pode ser dissolvida num volume tão baixo quanto possível de um solvente orgânico adequado (por exemplo, hexano, acetona ou clorofórmio). Seguidamente, esta solução é misturada com 10 g de areia quartzítica fina por recipiente de ensaio. Deixa-se evaporar o solvente até à sua eliminação total da areia; adiciona-se, então, esta à quantidade adequada de sedimentos por cada copo de ensaio. Para solubilizar, dispersar ou emulsionar a substância em estudo apenas podem utilizar-se agentes de fácil volatilização. Ao preparar os sedimentos, importa ter em conta a areia associada à substância em estudo e a mistura de areia (ou seja, utiliza-se menos areia na preparação dos sedimentos). Deve ter-se o cuidado de assegurar que a substância em estudo adicionada aos sedimentos se encontra total e uniformemente distribuída nestes. Se necessário, podem analisar-se subamostras, a fim de determinar o grau de homogeneidade.

PLANEAMENTO DO ENSAIO

17. O planeamento do ensaio consiste na escolha do número e dos intervalos das concentrações de ensaio, do número de recipientes para cada concentração e do número de larvas por recipiente. Descreve-se de seguida o método de estimativa dos pontos CE e do NOEC, bem como de realização de ensaios do limite.

Análise por regressão

18. As concentrações testadas no ensaio deverão incluir as concentrações às quais se observam efeitos (por exemplo, CE_{15} e CE_{50}) e abranger a gama de concentrações para as quais o efeito da substância em estudo é significativo. De modo geral, é possível melhorar a exatidão e, em especial, a validade das estimativas das concentrações que produzem efeitos (CE_x) se essas concentrações se situarem na gama de concentrações ensaiadas. Devem evitar-se extrapolações muito abaixo da concentração positiva mais baixa ou acima da concentração mais elevada. É útil efetuar um ensaio exploratório preliminar para a escolha da gama de concentrações a utilizar no ensaio (ver o ponto 27).

▼M4

19. Caso se pretenda estimar uma CE_x, devem ser utilizados, pelo menos, cinco concentrações e três replicados de cada concentração. Em qualquer caso, para obter uma boa estimativa, é aconselhável ensaiar um número suficiente de concentrações. O fator entre as concentrações não deve ser superior a dois (se a curva de resposta à dose tiver um declive reduzido). Pode reduzir-se o número de replicados de cada concentração se for aumentado o número de concentrações de ensaio com respostas diferentes. O aumento do número de replicados ou a redução dos intervalos entre concentrações produz, em geral, intervalos de confiança mais estreitos. Caso se pretenda estimar a sobrevivência e o crescimento das larvas a 10 dias, é necessário utilizar mais replicados.

Estimativa de NOEC/LOEC

20. Caso se pretenda estimar o NOEC ou o LOEC, devem ensaiar-se cinco concentrações com, pelo menos, quatro replicados, não devendo o fator entre as concentrações ser superior a dois. O número de replicados deverá ser suficiente para garantir a possibilidade estatística de detetar de forma adequada uma diferença de 20 % relativamente ao controlo, com um grau de significância de 5 % (p = 0,05). No respeitante às taxas de desenvolvimento, é geralmente adequada uma análise de variância (ANOVA), como o teste de Dunnett ou o teste de Williams (17)(18)(19)(20). Quanto à taxa de emergência, podem utilizar-se os testes de Cochran-Armitage, o teste exato de Fisher (com a correção de Bonferroni) ou o teste de Mantel-Haentzal.

Ensaio do limite

21. Caso não sejam detetados efeitos no ensaio exploratório preliminar de seleção das concentrações, pode proceder-se a um ensaio do limite (uma concentração de ensaio e uma de controlo). O objetivo consiste em realizar um ensaio numa concentração suficientemente elevada para permitir aos decisores excluir a possibilidade de efeitos tóxicos da substância em estudo, sendo o limite fixado a uma concentração cuja ocorrência não se prevê em caso algum. Recomenda-se a utilização de 1 000 mg/kg (massa seca). Em geral, são necessários, pelo menos, seis replicados dos organismos expostos e de controlo. Deve comprovar-se existir a possibilidade estatística de detetar de forma adequada uma diferença de 20 % relativamente ao controlo, com um grau de significância de 5 % (p = 0,05). No que respeita ao efeito nas taxas de desenvolvimento e na massa, o teste *t* é um método estatístico adequado se os dados cumprirem os requisitos do teste (normalidade e variâncias homogéneas). Se estes requisitos não forem preenchidos, pode utilizar-se um teste *t* de variância desigual ou um teste não paramétrico, como o de Wilcoxon-Mann-Whithey. No que respeita à taxa de emergência, o teste exato de Fisher é adequado.

PROCEDIMENTO

Condições de exposição

Preparação do sistema sedimentos enriquecidos-água

22. Na aplicação da substância em estudo, recomenda-se o procedimento de enriquecimento descrito no método de ensaio C.8: "Toxicidade em relação às minhocas" (14). Coloca-se nos recipientes os sedimentos enriquecidos, adicionando-se água sobrenadante de forma a obter uma razão volúmica sedimentos-água de 1:4 (ver os pontos 11 e 15). A espessura da camada de sedimentos deve situar-se na gama 1,5-3 cm. Para evitar a separação de componentes dos sedimentos e a ressuspensão de materiais finos durante a criação da coluna de água, os sedimentos podem ser cobertos, enquanto a água é vertida, com um disco de plástico que se remove imediatamente depois. Podem também utilizar-se outros dispositivos.

23. Os recipientes de ensaio devem ser cobertos (por exemplo, com placas de vidro). Se necessário, o nível inicial de água pode ser reposto durante o ensaio, para compensar a evaporação. Para tal, deve utilizar-se água destilada ou desionizada, de modo a evitar a acumulação de sais.

▼M4

Estabilização

24. Quando estiverem preparados os sedimentos enriquecidos e a fase aquosa sobrenadante, é conveniente permitir a partição da substância em estudo entre a fase aquosa e os sedimentos (3)(4)(6)(13). A partição deve ocorrer, de preferência, às condições de temperatura e arejamento utilizadas no ensaio. O tempo necessário para atingir o equilíbrio depende dos sedimentos e do produto químico, podendo variar de algumas horas a vários dias e mesmo, em casos raros, a 4 ou 5 semanas. Dado que, nesse período, muitos produtos químicos são passíveis de sofrer degradação, não se espera até o equilíbrio total ser alcançado, recomendando-se a adoção de um período de equilíbrio de 48 horas. No final deste período, deve medir-se a concentração da substância em estudo na água sobrenadante, na água dos poros e nos sedimentos, pelo menos no caso da concentração máxima e de uma concentração menor (ver o ponto 38). Estas determinações analíticas da substância em estudo permitem o cálculo do balanço de massas e a expressão dos resultados com base nas concentrações medidas.

Introdução dos organismos em estudo

25. Quatro a cinco dias antes da introdução dos organismos em estudo nos recipientes de ensaio, devem colher-se aglomerados de ovos das culturas e colocá-los em pequenos recipientes com o meio de cultura. Pode utilizar-se meio proveniente da cultura-mãe ou um meio recentemente preparado. Neste último caso, importa adicionar ao meio de cultura uma pequena quantidade de alimentos, como, por exemplo, algas verdes e/ou algumas gotas de filtrado de uma suspensão de alimento para peixes finamente moído (ver o apêndice 2). Apenas devem ser utilizados aglomerados de ovos de postura recente. Normalmente, as larvas começam a eclodir alguns dias após a postura dos ovos (2 a 3 dias, a 20 °C, no caso das *Chironomus riparius*, e 1 a 4 dias no caso das *Chironomus tentans*, a 23 °C, e das *Chironomus yoshimatsui*, a 25 °C); o crescimento das larvas ocorre em quatro estádios larvares, cada um com a duração de 4 a 8 dias. Utilizar no ensaio larvas do primeiro estádio larvar (2-3 ou 1-4 dias após a eclosão). O estádio larvar dos insetos pode, eventualmente, ser verificado por exame da largura da cápsula cefálica (6).

26. Com o auxílio de uma pipeta embotada, coloca-se aleatoriamente vinte larvas do primeiro estádio larvar em cada recipiente de ensaio contendo os sedimentos enriquecidos e a água. O arejamento da água tem de ser suspenso durante a colocação das larvas nos recipientes de ensaio, assim permanecendo nas 24 horas subsequentes a esta operação (ver os pontos 25 e 32). Consoante o tipo de ensaio realizado (ver os pontos 19 e 20), o número de larvas por concentração deve ser, no mínimo, de 60, no caso de estimativas de pontos CE, e de 80, no caso das determinações de NOEC.

Concentrações de ensaio

27. Pode ser útil efetuar um ensaio exploratório para a determinação da gama de concentrações a utilizar no ensaio definitivo. Para o efeito, recorre-se a uma série de concentrações espaçadas da substância em estudo. Garantindo que a densidade de quironomídeos por unidade de superfície seja idêntica à utilizada no ensaio definitivo, os quironomídeos são expostos a cada concentração da substância em estudo por um período que permita uma estimativa das concentrações de ensaio adequadas, não sendo necessários replicados.

28. As concentrações a utilizar no ensaio definitivo são decididas com base nos resultados do ensaio exploratório. Devem ser utilizadas pelo menos cinco concentrações, selecionadas do modo descrito nos pontos 18 a 20.

▼M4

Controlos

29. Deve utilizar-se no ensaio um número adequado de recipientes de controlo sem a substância em estudo, mas com os sedimentos (ver os pontos 19-20). Caso se recorra a um solvente para a incorporação da substância em estudo (ver o ponto 16), deve efetuar-se um controlo utilizando sedimentos com solvente.

Sistema de ensaio

30. São utilizados sistemas estáticos. Em casos excecionais, pode utilizar-se sistemas semiestáticos ou sistemas de escoamento com renovação intermitente ou contínua da água sobrenadante, por exemplo, se as características de qualidade da água se tornarem inadequadas ao organismo em estudo ou afetarem o equilíbrio químico (isto é, se os teores de oxigénio dissolvido baixarem demasiado, se a concentração de produtos de excreção aumentar demasiado, se ocorrer lixiviação de minerais dos sedimentos que afete o pH e/ou dureza da água, etc.). Deve preferir-se, contudo, o recurso a outros métodos para melhorar a qualidade da água sobrenadante, como o arejamento, que é, em geral, suficiente.

Alimentação

31. É necessário alimentar as larvas, de preferência diariamente ou, no mínimo, três vezes por semana. Utilizar alimento para peixes (suspensão em água ou finamente moído, por exemplo, Tetra-Min or Tetra-Phyllou; ver pormenores no apêndice 2); a quantidade de 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg no caso de *C. yoshimatsui*) por larva e dia afigura-se adequada para as larvas jovens, nos primeiros 10 dias. Após este período, pode ser necessária uma quantidade ligeiramente superior: 0,5-1 mg por larva e dia deve bastar para o resto do ensaio. A ração alimentar deve ser reduzida a todos os organismos expostos e aos controlos caso se observe crescimento fúngico ou se verifique mortalidade nos controlos. Se não for possível impedir o crescimento fúngico, deve repetir-se o ensaio. Quando se estuda substâncias fortemente adsorventes (por exemplo, com log K_{ow} > 5) ou substâncias ligadas aos sedimentos por ligações covalentes, a quantidade de alimentos necessária para assegurar a sobrevivência e o crescimento natural dos organismos pode ser adicionada aos sedimentos formulados, antes do período de estabilização. Para esse fim, devem ser utilizados matérias vegetais em vez de alimentos para peixes; a título de exemplo, 0,5 % (massa seca) de folhas finamente moídas de espécies como a urtiga comum (*Urtica dioeca*), a amoreira (*Morus alba*), o trevo branco (*Trifolium repens*), o espinafre (*Spinacia oleracea*) ou outras matérias de origem vegetal (*Cerophyl* ou α-celulose).

Condições de incubação

32. O arejamento ligeiro da água sobrenadante nos recipientes de ensaio deve iniciar-se, de preferência, 24 horas após a introdução das larvas, prosseguindo ao longo de todo o ensaio (deve evitar-se que a concentração de oxigénio dissolvido baixe para valores inferiores a 60 % do VSA). O arejamento é efetuado por intermédio de uma pipeta de Pasteur de vidro, fixada 2-3 cm acima da camada de sedimentos (caudal: uma ou poucas bolhas por segundo). No ensaio de produtos químicos voláteis, pode optar-se por não arejar o sistema sedimentos-água.

33. O ensaio é realizado a temperatura constante (20 °C ± 2 °C). No caso das espécies *C. tentans* e *C. yoshimatsui*, as temperaturas recomendadas são 23 °C e 25 °C (± 2 °C), respetivamente. Utiliza-se um período de irradiação de 16 horas, com uma intensidade luminosa de 500 a 1 000 lux.

▼M4

Duração da exposição

34. A exposição começa com a introdução das larvas nos recipientes enriquecidos e nos recipientes de controlo. A duração máxima da exposição é de 28 dias para a *C. riparius* e a *C. yoshimatsui* e de 65 dias para a *C. tentans*. Se os insetos emergirem precocemente, pode pôr-se termo ao ensaio, no mínimo, cinco dias após a emergência do último indivíduo adulto nos recipientes de controlo.

Observações

Emergência

35. Determina-se o tempo de desenvolvimento e o número total de insetos machos e fêmeas totalmente emergidos. Os machos são facilmente identificados pelas suas antenas plumosas.

36. Os recipientes de ensaio devem ser observados pelo menos três vezes por semana, a fim de apreciar visualmente qualquer comportamento anormal (por exemplo, saída dos sedimentos, natação anormal) em relação aos recipientes de controlo. Durante o período de emergência previsto, é necessário proceder à contagem diária dos insetos emergidos. O sexo e o número de insetos totalmente emergidos são registados diariamente. Após a identificação, remove-se os insetos dos recipientes. Quaisquer aglomerados de ovos postos antes do termo do ensaio devem ser registados e, de seguida, removidos, para evitar a reintrodução de larvas nos sedimentos. Regista-se também o número de ninfas visíveis que não emergiram. O apêndice 5 contém orientações sobre a mensuração da emergência.

Crescimento e sobrevivência

37. Se for necessário obter dados sobre a sobrevivência e o crescimento das larvas em dez dias, devem prever-se recipientes de ensaio suplementares desde o início, para que possam ser utilizados posteriormente. Os sedimentos destes recipientes são passados por um crivo com abertura de malha de 250 μm, para reter as larvas. Os critérios de morte são a imobilidade e a ausência de reação a estímulos mecânicos. As larvas não recuperadas devem também ser contadas como mortas (as larvas que morreram no início do ensaio podem ter sido degradadas por micróbios). Determina-se a massa seca, isenta de cinzas, de larvas sobreviventes em cada recipiente de ensaio, calculando-se a massa seca média por recipiente. É útil determinar o estádio larvar das larvas sobreviventes; para tal, pode recorrer-se à medição da largura da cápsula cefálica de cada indivíduo.

Determinações analíticas

Concentração da substância em estudo

38. Antes do início do ensaio (isto é, da introdução das larvas), procede-se à colheita de amostras da massa de sedimentos de, pelo menos, um recipiente por exposição, para a determinação analítica da concentração da substância em estudo. Recomenda-se que sejam analisadas, no início (ver o ponto 24) e no final do ensaio, no mínimo, amostras da água sobrenadante, da água dos poros e dos sedimentos correspondentes à concentração mais elevada e a uma concentração inferior. Estas determinações da concentração da substância em estudo proporcionam informações sobre o comportamento e/ou a partição da mesma no sistema água-sedimentos.

39. Quando se efetuam medições intermédias (por exemplo, no 7.º dia) e a análise necessita de amostras grandes que não podem ser colhidas dos recipientes de ensaio sem influenciar o sistema em estudo, as determinações analíticas devem ser realizadas com amostras colhidas de recipientes de ensaio suplementares tratados da mesma forma (incluindo a presença dos organismos em estudo), mas que não são alvo de observações biológicas.

▼M4

40. A centrifugação a cerca de 10 000 g e 4 ºC, durante 30 minutos, é o procedimento recomendado para isolar a água intersticial. No entanto, caso se demonstre que a substância em estudo não é adsorvida aos filtros, a filtragem também é aceitável. Em alguns casos, se a amostra for demasiado pequena, poderá não ser possível analisar concentrações na água dos poros.

Parâmetros físico-químicos

41. O pH e a temperatura dos recipientes de ensaio devem ser medidos de forma adequada (ver o ponto 10). A dureza e o ião amónio devem ser medidos nos recipientes de controlo e num recipiente de ensaio com a concentração mais elevada, no início e no final do ensaio.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

42. O objetivo deste ensaio consiste em determinar o efeito da substância em estudo nas taxas de desenvolvimento e no número total de insetos machos e fêmeas totalmente emergidos ou, no caso dos ensaios de 10 dias, os efeitos na sobrevivência e no peso das larvas. Se não houver indicação de sensibilidades estatisticamente diferentes entre os sexos, os resultados relativos aos machos e às fêmeas podem ser agrupados para efeitos de análise estatística. As diferenças de sensibilidade entre os sexos podem ser avaliadas estatisticamente, por exemplo, recorrendo a um ensaio de tabela de contingência χ^2-r x 2. Se necessário, determina-se a sobrevivência das larvas e a massa seca por recipiente após 10 dias.

43. As concentrações com efeitos, expressas em relação à massa seca, são calculadas de preferência a partir das concentrações medidas nos sedimentos no início do ensaio (ver o ponto 38).

44. Para efetuar uma estimativa pontual do valor CE_{50} ou de qualquer valor CE_x, podem equiparar-se os dados estatísticos por recipiente aos de ensaios idênticos reais. No cálculo de um intervalo de confiança para qualquer valor CE_x, importa ter em conta a variabilidade entre recipientes, ou deve demonstrar-se que essa variabilidade é tão reduzida que pode ser ignorada. Se o modelo for ajustado pelo método dos mínimos quadrados, deve aplicar-se uma transformação aos dados estatísticos por recipiente, para melhorar a homogeneidade da variância. Contudo, os valores de CE_x só devem ser calculados após retransformação da resposta no valor inicial.

45. Se a análise estatística tiver por objetivo determinar o NOEC/LOEC utilizando hipóteses estatísticas, importa ter em conta a variabilidade entre recipientes, por exemplo, aplicando um método ANOVA hierarquizado. Se não se verificarem os pressupostos comuns do método ANOVA, testes mais robustos podem constituir uma alternativa adequada (21).

Taxa de emergência

46. As taxas de emergência são dados de "tudo ou nada", que podem ser analisados através de um teste de Cochran-Armitage aplicado de forma regressiva, nos casos em que se prevê uma relação monótona entre a dose fornecida e a resposta e os dados são compatíveis com a previsão. Caso contrário, pode recorrer-se a um teste exato de Fisher ou a um teste de Mantel-Haentzal com valores *p* ajustados segundo o método de Bonferroni-Holm. Se, para a mesma concentração, houver indícios de uma maior variabilidade entre replicados do que a sugerida por uma distribuição binomial (frequentemente referida como variação "extrabinomial"), deve utilizar-se um teste exato de Fisher ou um teste de Cochran-Armitage robusto, como proposto na referência 21.

▼M4

Determina-se a soma dos insetos emergidos por recipiente, ne, que é seguidamente dividida pelo número de larvas nele introduzidas, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

em que:

ER = Taxa de emergência

n_e = Número de insetos emergidos no recipiente

n_a = Número de larvas introduzidas no recipiente

47. Uma alternativa mais adequada a amostras grandes, quando se regista variância extrabinomial, consiste em considerar a taxa de emergência uma resposta contínua e aplicar procedimentos como o teste de William, caso se preveja uma relação monótona entre a dose fornecida e a resposta, compatível com os dados de taxa de emergência em causa. Por seu turno, o teste de Dunnett é adequado aos casos em que não se regista uma relação monótona. Neste contexto, uma amostra "grande" é definida como aquela em que o número total de insetos emergidos e não emergidos é, em ambos os casos, superior a cinco por replicado (recipiente).

48. A aplicação de métodos ANOVA implica que os valores de taxa de emergência sejam sujeitos a uma transformação de arco-seno da raiz quadrada ou a uma transformação de Tukey-Freeman, de forma a obter uma distribuição aproximadamente normal e uniformizar as variâncias. Os testes de Cochran-Armitage, exato de Fisher (Bonferroni) e Mantel-Haentzal podem ser aplicados quando se utilizam frequências absolutas. A transformação de arco-seno da raiz quadrada consiste em calcular o inverso do seno ($\sin^{-1}$) da raiz quadrada do valor da taxa de emergência.

49. No respeitante às taxas de emergência, os valores de CE_x são calculados por análise de regressão – por exemplo, por recurso aos modelos *probit* (22), *logit* ou Weibull ou a programas informáticos comerciais adequados. Em caso de fracasso da análise de regressão (por exemplo, se o número de respostas parciais for inferior a dois), utilizam-se outros métodos não paramétricos, como a média móvel ou a simples interpolação.

Taxa de desenvolvimento

50. O tempo médio de desenvolvimento representa o tempo médio decorrido entre a introdução das larvas (dia 0 do ensaio) e a emergência da coorte experimental de insetos (para o cálculo do tempo de desenvolvimento real, é necessário ter em conta a idade das larvas no momento da introdução). A taxa de desenvolvimento é o inverso do tempo de desenvolvimento (unidade: 1/dia) e representa a quantidade de desenvolvimento larvar que ocorre por dia. A taxa de desenvolvimento é o parâmetro preferido para a avaliação destes estudos de toxicidade dos sedimentos, dado que a sua variância é mais baixa que a do tempo de desenvolvimento, sendo também mais homogénea e mais próxima da distribuição normal. Os testes paramétricos mais potentes estão mais adaptados à taxa de desenvolvimento do que ao tempo de desenvolvimento. Considerando a taxa de desenvolvimento uma resposta contínua, os valores de CE_x podem ser estimados por recurso a uma análise de regressão – por exemplo, como descrito em (23)(24).

51. No contexto dos testes estatísticos que se seguem, considera-se que o número de insetos observado no dia de inspeção x emergiu no ponto médio do intervalo de tempo compreendido entre o dia x e o dia x-d (d = duração do intervalo de inspeção, em geral 1 dia). A taxa de desenvolvimento média por recipiente (é calculada com base nas seguintes equações:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

em que:

$\bar{x}$: Taxa de desenvolvimento média por recipiente

i: Índice do intervalo de inspeção

m: Número máximo de intervalos de inspeção

f_i: Número de insetos emergidos no intervalo de inspeção *i*

n_e: Número total de insetos emergidos no final do ensaio ($= \sum f_i$)

x_i: Taxa de desenvolvimento dos insetos emergidos no intervalo *i*

$$x_i = \frac{1}{\left(dia_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

em que:

dia_i: Dia da inspeção (n.º de dias decorridos desde a introdução dos organismos)

d_i: Duração do intervalo de inspeção *i* (dias, em geral 1 dia)

Relatório dos ensaios

52. O relatório dos ensaios deve incluir, no mínimo, as seguintes informações:

Substância em estudo:

— natureza física e, quando pertinente, propriedades físico-químicas (solubilidade na água, pressão de vapor, coeficiente de partição no solo — ou nos sedimentos, se disponível —, estabilidade em água, etc.),

— dados de identificação química (denominação comum, denominação química, fórmula estrutural, número CAS, etc.), incluindo o grau de pureza e o método analítico de quantificação da substância.

Espécies utilizadas nos ensaios:

— animais: espécie, nome científico, origem dos organismos e condições de reprodução,

— informações sobre o manuseamento dos aglomerados de ovos e das larvas,

— idade dos animais quando introduzidos nos recipientes de ensaio.

Condições experimentais:

— sedimentos utilizados, isto é, de origem natural ou formulados,

— no caso dos sedimentos naturais, localização e descrição do local de colheita, incluindo, se possível, o historial de contaminação; características: pH, teor de carbono orgânico, razão C/N e granulometria (se pertinente),

— preparação dos sedimentos formulados: ingredientes e características (teor de carbono orgânico, pH, humidade, etc., no início dos ensaios),

— preparação da água para os ensaios, caso seja utilizada água reconstituída, e respetivas características (concentração de oxigénio, pH, condutividade, dureza, etc., no início dos ensaios),

— espessura dos sedimentos e da água sobrenadante,

— volume de água sobrenadante e de água dos poros; massa do sedimento húmido com e sem a água dos poros,

▼M4

— recipientes de ensaio (material e dimensões),

— método de enriquecimento dos sedimentos: concentrações de ensaio utilizadas, número de replicados e solvente utilizado, se for o caso,

— fase de estabilização do sistema sedimentos enriquecidos-água: duração e condições,

— condições de incubação: temperatura, ciclo de luz e intensidade luminosa, arejamento (frequência e intensidade),

— informações pormenorizadas sobre a alimentação dos organismos, incluindo o tipo de alimentos, a preparação, a quantidade e o regime alimentar.

Resultados:

— concentrações de ensaio nominais, concentrações de ensaio medidas e resultados de todas as análises efetuadas para determinar a concentração da substância em estudo nos recipientes de ensaio,

— qualidade da água nos recipientes de ensaio (pH, temperatura, oxigénio dissolvido, dureza e teor de ião amónio),

— renovação da água evaporada nos ensaios, se for o caso,

— número de insetos machos e fêmeas emergidos por recipiente e dia,

— número de larvas que não originaram insetos, por recipiente,

— massa seca média de larvas por recipiente e, se for caso disso, por estádio larvar,

— percentagem de emergência por replicado e por concentração de ensaio (machos e fêmeas no seu conjunto),

— taxa média de desenvolvimento de insetos totalmente emergidos por replicado e por concentração de ensaio (machos e fêmeas no seu conjunto),

— estimativas de parâmetros de toxicidade, como, por exemplo, CEx (e os intervalos de confiança associados), NOEC e/ou LOEC e métodos estatísticos utilizados para a determinação dos mesmos,

— discussão dos resultados, incluindo qualquer influência nos resultados do ensaio decorrente de alterações efetuadas ao presente método de ensaio.

REFERÊNCIAS:

(1) BBA (1995). Long-term *toxicity* test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Editado por M. Streloke e H. Köpp. Berlim, 1995.

(2) Fleming R. *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. Agosto de 1994. WRc, Reino Unido.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. WOSTA Workshop realizado nos Países Baixos.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. p. 1125-1241. *In* ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International. West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. Dezembro de 1997.

▼M4

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Segunda edição. EPA 600/R-99/064. Março de 2000. Revisão da primeira edição de junho de 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., Kirby R.S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontário, Canadá.

(10) Sugaya Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. *Jp. J. Sanit. Zool.* 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). *Jp. J. Sanit. Zool.* 37(1): 47-57.

(12) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. Setembro de 1995.

(14) Capítulo C.8 deste anexo: Toxicidade em relação às minhocas.

(15) Suedel B.C., Rodgers J.H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1163-1175.

(16) Naylor C., Rodrigues C. (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. *Chemosphere* 31: 3291-3303.

(17) Dunnett C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statis. Assoc.* 50: 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.

(19) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.

(20) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510-531.

(21) Rao J.N.K., Scott A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48: 577-585.

(22) Christensen E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213-221.

(23) Bruce, Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 1485-1494.

(24) Slob W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.

▼**M4**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

No âmbito do presente método de ensaio, aplicam-se as seguintes definições:

Sedimentos formulados ou reconstituídos, artificiais ou sintéticos: mistura de matérias utilizadas para simular os componentes físicos de sedimentos naturais.

Água sobrenadante: água situada acima da superfície dos sedimentos, no recipiente de ensaio.

Água intersticial ou água dos poros: água que ocupa o espaço entre as partículas de sedimentos e de solo.

Sedimentos enriquecidos: sedimentos aos quais foi adicionada a substância em estudo.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

▼M4

Apêndice 2

Recomendações para a cultura de *chironomus riparius*

1. As larvas de *Chironomus* podem ser criadas em caixas de cristalização ou recipientes de maiores dimensões. Espalha-se no fundo do recipiente areia quartzítica fina de modo a constituir uma camada fina com 5 a 10 mm de espessura. Verificou-se que o *kieselguhr* (p. ex. Merck 8117) é também um substrato adequado; neste caso, pode utilizar-se uma camada mais fina, da ordem de poucos milímetros. Adiciona-se de seguida uma coluna de vários centímetros de uma água adequada. Se necessário, os níveis de água podem ser repostos para compensar a evaporação e evitar a dessecação. A água pode ser substituída, se necessário. Deve efetuar-se um arejamento ligeiro. Os recipientes de criação das larvas devem ser mantidos em gaiolas adequadas, de forma a evitar fugas de adultos emergentes. A gaiola deve ser suficientemente grande (no mínimo, cerca de 30 x 30 x 30 cm), para permitir a enxameação dos adultos emergidos, sem o que poderá não ocorrer copulação.

2. As gaiolas devem ser mantidas à temperatura ambiente ou a uma temperatura constante de 20 ± 2 °C, com um período de luminosidade (cerca de 1 000 lux) de 16 horas e oito horas de escuridão. Existem referências documentais de que um teor de humidade relativa do ar inferior a 60 % pode impedir a reprodução.

Água de diluição

3. Pode utilizar-se qualquer água natural ou reconstituída adequada. Utiliza-se em geral água de poços, água da rede de abastecimento desclorada e meios artificiais (por exemplo, meio Elendt M4 ou M7; ver abaixo). A água tem de ser arejada antes da utilização. Se necessário, a água das culturas pode ser renovada por vazamento ou sifonagem cuidadoso da água dos recipientes de cultura, para não destruir os tubos das larvas.

Alimentação das larvas

4. As larvas de *Chironomus* são alimentadas com cerca de 250 mg por recipiente e por dia de um alimento floculado para peixes (Tetra Min®, Tetra Phyll® ou outra marca semelhante). Os alimentos podem ser administrados na forma de um pó seco finamente moído ou de uma suspensão em água: adicionar 1,0 g de alimento floculado a 20 ml de água de diluição e misturar de modo a obter uma mistura homogénea. Esta preparação pode ser administrada ao caudal aproximado de 5 ml por recipiente e por dia (agitar antes da utilização). Pode administrar-se às larvas de idade superior uma maior quantidade de alimento.

5. A alimentação é ajustada em função da qualidade da água. Se o meio de cultura se tornar turvo, deve reduzir-se a alimentação. A administração de alimentos deve ser objeto de um registo minucioso. A escassez de alimentos causaria migração das larvas para a coluna de água, enquanto uma alimentação demasiado rica aumentaria a atividade microbiana e reduziria a concentração de oxigénio. Ambas estas condições podem resultar numa redução das taxas de crescimento.

6. Ao preparar novos recipientes de cultura, podem também adicionar-se algumas células de algas verdes (por exemplo, *Scenedesmus subspicatus* e *Chlorella vulgaris*).

Alimentação dos adultos emergidos

7. Alguns experimentadores sugeriram que um tampão de algodão embebido numa solução saturada de sacarose pode servir de alimento para os adultos emergidos.

▼M4

Emergência

8. À temperatura de 20 ± 2 °C, os adultos começam a emergir dos recipientes de criação das larvas decorridos 13 a 15 dias. Os machos são facilmente distinguidos pelas suas antenas plumosas.

Aglomerados de ovos

9. Quando se encontrarem presentes adultos nas gaiolas de criação, deve verificar-se três vezes por semana se ocorre a deposição de aglomerados gelatinosos de ovos nos recipientes de criação das larvas. Se tal suceder, devem ser removidos com cuidado e transferidos para uma pequena cápsula com uma amostra da água de incubação. Os aglomerados de ovos são utilizados para iniciar novas culturas noutros recipientes (p. ex., 2-4 aglomerados de ovos por recipiente) ou em ensaios de toxicidade.

10. As larvas do primeiro estádio larvar devem eclodir decorridos 2-3 dias.

Preparação de novos recipientes de cultura

11. Quando as culturas estiverem estabelecidas, deverá ser possível preparar um novo recipiente de cultura de larvas por semana, ou com uma frequência menor (consoante os requisitos dos ensaios), removendo os recipientes mais antigos após a emergência dos insetos adultos. O recurso a este sistema permite obter um aprovisionamento regular de insetos adultos com uma gestão mínima.

Preparação das soluções de ensaio M4 e M7

12. O meio M4 foi descrito por Elendt (1990). O meio M7 é preparado do mesmo modo que o M4, exceto no que respeita às substâncias indicadas no quadro 1, cujas concentrações são quatro vezes inferiores às do meio M4. Encontra-se em preparação um artigo sobre o meio M7 (Elendt, comunicação pessoal). A solução de ensaio não deve ser preparada em conformidade com as indicações de Elendt e Bias (1990), dado as concentrações de NaSiO3.5H2O, NaNO3, KH2PO4 e K2HPO4 apresentadas para a preparação das soluções-mãe não serem adequadas.

Preparação do meio M7

13. Cada solução-mãe (I) é preparada individualmente, sendo preparada uma solução-mãe combinada (II) a partir dessas soluções (I) (ver o quadro 1). O meio M7 é preparado diluindo para 1 l, com água desionizada, 50 ml da solução-mãe combinada (II) e as quantidades de cada solução-mãe de macronutrientes indicadas no quadro 2. Prepara-se uma solução-mãe de vitaminas juntando três vitaminas a água desionizada, como indicado no quadro 3; adiciona-se 0,1 ml da solução-mãe combinada de vitaminas ao meio M7 final pouco antes da utilização (a solução-mãe de vitaminas é armazenada por congelação, em pequenas alíquotas). O meio é arejado e estabilizado.

REFERÊNCIAS

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Editado por M. Streloke e H.Köpp. Berlim, 1995.

▼**M4**

Quadro 1

Soluções-mãe de elementos vestigiais para os meios M4 e M7

Soluções-mãe (I)	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Para preparar a solução-mãe combinada (II), misturar as seguintes quantidades (ml) de soluções-mãe (I) e diluir para 1 litro com água desionizada		Concentrações finais nas soluções de ensaio (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Estas substâncias são diferentes nos meios M4 e M7, como se indica no quadro.
(2) Estas soluções são preparadas individualmente, misturadas e colocadas de imediato numa autoclave.

Quadro 2

Soluções-mãe de macronutrientes para os meios M4 e M7

	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Quantidade de soluções-mãe de macronutrientes adicionada para preparar os meios M4 e M7 (ml/l)	Concentrações finais nas soluções de ensaio M4 e M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Quadro 3

Soluções-mãe de vitaminas para os meios M4 e M7. As três soluções de vitaminas são combinadas para originar uma única solução-mãe.

	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Quantidade de solução-mãe de vitaminas adicionada para preparar os meios M4 e M7 (ml/l)	Concentrações finais nas soluções de ensaio M4 e M7 (mg/l)
Cloridrato de tiamina	750	0,1	0,075
Cianocobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotina	7,5	0,1	0,00075

REFERÊNCIAS

Elendt B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P., Bias W.-R. (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Apêndice 3

PREPARAÇÃO DOS SEDIMENTOS FORMULADOS

Composição dos sedimentos

A composição dos sedimentos formulados deve ser a seguinte:

Componente	Características	% da massa seca dos sedimentos
Turfa	Turfa de *Sphagnum*, com pH tão próximo quanto possível do intervalo 5,5-6,0, sem restos visíveis de plantas, finamente moída (granulometria ≤ 1 mm) e seca ao ar	4-5
Areia quartzítica	Granulometria: > 50 % das partículas de granulometria na gama 50-200 μm	75-76
Argila caulinítica	Teor de caulinite ≥ 30 %	20
Carbono orgânico	Ajustado por adição de turfa e areia	2 (±0,5)
Carbonato de cácio	$CaCO_3$ pulverizado quimicamente puro	0,05-0,1
Água	Condutividade ≤ 10 μS/cm	30-50

Preparação

A turfa é seca ao ar e moída até se obter um pó fino. Prepara-se uma suspensão da quantidade necessária de turfa pulverizada em água desionizada, por recurso a um dispositivo de homogeneização de alta eficiência. O pH desta suspensão é ajustado para 5,5 ± 0,5 com $CaCO_3$. A suspensão é acondicionada durante, pelo menos, dois dias, com agitação ligeira a 20 ± 2 °C, para estabilizar o pH e estabelecer um perfil microbiano estável. Findo este período, determina-se novamente o pH, que deve ser de 6,0 ± 0,5. A suspensão de turfa é então misturada com os outros componentes (areia e argila caulinítica) e água desionizada, de forma a obter sedimentos homogéneos com um teor de água da ordem de 30 %--50 % da massa seca dos sedimentos. O pH da mistura final é determinado uma vez mais e, se necessário, ajustado para 6,5-7,5 com $CaCO_3$. São colhidas amostras dos sedimentos para determinar o resíduo seco e o teor de carbono orgânico. Recomenda-se que, antes de ser utilizados num ensaio de toxicidade em quironomídeos, os sedimentos formulados sejam acondicionados durante sete dias em condições idênticas às do ensaio subsequente.

Armazenagem

Os componentes secos para a preparação dos sedimentos artificiais podem ser armazenados num local seco e fresco, à temperatura ambiente. Os sedimentos formulados (húmidos) não devem ser armazenados antes da sua utilização nos ensaios. Devem ser utilizados imediatamente após o período de acondicionamento de sete dias que conclui a sua preparação.

REFERÊNCIAS

Capítulo C.8 deste anexo: Toxicidade em relação às minhocas.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

▼**M4**

Apêndice 4

Características químicas de uma água de diluição adequada

Substância	Concentrações
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amoníaco não ionizado	< 1 µg/l
Dureza expressa em $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Cloro residual	< 10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	< 50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados e dos bifenilos policlorados, totais	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

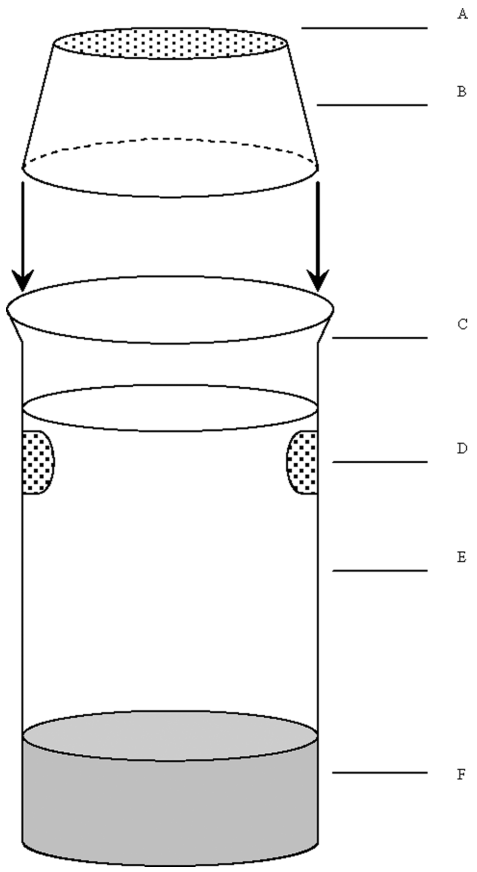
(*) Contudo, caso se suspeite da existência de uma interação entre os iões responsáveis pela dureza e a substância em estudo, deve utilizar-se uma água mais macia (nesse caso, o meio Elendt M4 não pode ser utilizado).

▼**M4**

Apêndice 5

Orientações para a monitorização da emergência das larvas de quironomídeos

Os copos de ensaio são munidos de armadilhas de emergência. Estas armadilhas são necessárias a partir do vigésimo dia, até ao final do ensaio. A título de exemplo, pode utilizar-se o dispositivo abaixo ilustrado:



A: tela de nylon

B: copo de plástico invertido

C: copo de exposição sem bico

D: aberturas recobertas, para renovação da água

E: água

F: sedimentos

▼M4

C.28. ENSAIO DE TOXICIDADE EM QUIRONOMÍDEOS NUM SISTEMA SEDIMENTOS-ÁGUA COM ÁGUA ENRIQUECIDA

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 219 da OCDE (2004). Foi concebido para avaliar os efeitos nas larvas dos dípteros de água doce *Chironomus* sp., que vivem nos sedimentos, de uma exposição prolongada a determinados produtos químicos. Baseia-se principalmente nas orientações da BBA, utilizando um sistema de ensaio sedimentos-água num cenário de exposição com solo artificial e coluna de água (1). Tem também em conta os atuais protocolos de ensaios de toxicidade para as espécies *Chironomus riparius* e *Chironomus tentans* que foram desenvolvidos na Europa (1)(2)(3) e na América do Norte (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) e foram sujeitos a um ensaio interlaboratorial (1)(6)(9). Podem também utilizar-se outras espécies de quironomídeos bem documentadas, como a *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. O cenário de exposição utilizado neste método de ensaio passa pelo enriquecimento da água na substância em estudo. A seleção do cenário de exposição adequado depende da finalidade do ensaio. O cenário de exposição na água, que envolve o enriquecimento da coluna de água na substância em estudo, tem por objetivo simular as perdas por dispersão na aplicação de pesticidas e abrange o pico de concentrações inicial na água dos poros. É também útil para outros tipos de exposições (incluindo o derrame de produtos químicos), com exceção dos processos de acumulação mais demorados do que o período do ensaio.

3. As substâncias a ensaiar com organismos que vivem nos sedimentos persistem, em geral, neste compartimento durante longos períodos. A exposição dos referidos organismos pode ter lugar por várias vias. A importância relativa de cada via de exposição, bem como o tempo de contribuição de cada uma delas para os efeitos tóxicos globais, depende das propriedades físico-químicas do produto químico em causa. No caso de substâncias fortemente adsorventes (por exemplo, com log K_{ow} > 5) ou de substâncias ligadas aos sedimentos por ligações covalentes, a ingestão de alimentos contaminados pode constituir uma via de exposição significativa. Para não subestimar a toxicidade das substâncias altamente lipófilas, pode ponderar-se a utilização de alimentos adicionados aos sedimentos antes da aplicação da substância em estudo. De forma a ter em conta todas as vias de exposição potenciais, o presente método de ensaio focaliza-se na exposição a longo prazo. A duração do ensaio é de 20 a 28 dias para *C. riparius* e *C. yoshimatsui* e de 28 a 65 dias para *C. tentans*. Se forem necessários dados a curto prazo para uma finalidade específica (por exemplo, para investigar os efeitos de um produto químico instável), é possível utilizar replicados adicionais a remover após de dez dias.

4. Os parâmetros medidos são o número total de indivíduos adultos emergidos e o tempo necessário para tal. Se forem necessários dados adicionais a curto prazo, recomenda-se que as determinações da sobrevivência e do crescimento das larvas apenas sejam efetuadas após um período de dez dias, recorrendo aos replicados adicionais que se justifiquem.

5. Recomenda-se a utilização de sedimentos formulados. Estes apresentam várias vantagens relativamente aos sedimentos naturais:

— a variabilidade experimental é reduzida porque os sedimentos constituem uma matriz "normalizada" reprodutível, eliminando-se a necessidade de encontrar fontes de sedimentos limpos e não contaminados,

— os ensaios podem ser iniciados em qualquer momento, eliminando-se assim a variabilidade sazonal dos sedimentos ensaiados, não havendo necessidade de pré-tratar os sedimentos para remover a fauna indígena; a utilização de sedimentos formulados reduz também os custos associados à colheita no terreno de quantidades suficientes de sedimentos para os ensaios de rotina,

▼M4

— a utilização de sedimentos formulados permite ainda efetuar comparações de toxicidade e classificar as substâncias em conformidade. Os dados de toxicidade obtidos a partir de ensaios com sedimentos naturais e artificiais mostraram-se comparáveis para vários produtos químicos (2).

6. São definidos no apêndice 1 alguns conceitos utilizados.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

7. Expõe-se larvas de quironomídeos do primeiro estádio larvar a uma gama de concentrações da substância em estudo em sistemas sedimentos-água. O ensaio inicia-se com a colocação de larvas do primeiro estádio larvar nos copos de ensaio com o sistema sedimentos-água, adicionando-se posteriormente a substância em estudo à água. A emergência de quironomídeos e as respetivas taxas de desenvolvimento são medidas no final do ensaio. Se necessário, a sobrevivência e o peso das larvas podem também ser determinados decorridos 10 dias, utilizando os replicados adicionais que se justifiquem. Os dados são analisados por recurso a um modelo de regressão, de forma a estimar a concentração que causaria uma redução de x% na emergência, na sobrevivência ou no crescimento das larvas (por exemplo, CE_{15}, CE_{50}, etc.), ou utilizando hipóteses estatísticas, para determinar a NOEC/ /LOEC. Este último método exige a comparação de valores que produzem efeitos com valores de controlo, por recurso a testes estatísticos.

INFORMAÇÕES SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

8. Devem ser conhecidas a solubilidade em água e a pressão de vapor da substância em estudo, bem como a partição nos sedimentos medida ou calculada e a estabilidade na água e nos sedimentos. Para a quantificação da substância em estudo na água sobrenadante, na água dos poros e nos sedimentos, deve dispor-se de um método analítico fiável, com exatidão e limite de deteção conhecidos e documentados. A fórmula estrutural e o grau de pureza da substância constituem igualmente informações úteis. O comportamento químico da substância em estudo (p. ex.: dissipação, degradação abiótica ou biótica, etc.) é também uma informação importante. Para mais orientações sobre o ensaio de substâncias cujas propriedades físico-químicas dificultam a realização dos ensaios, consultar a referência bibliográfica (12).

PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA

9. Pode testar-se periodicamente produtos químicos de referência com o objetivo de garantir a fiabilidade do protocolo e das condições de ensaio. As seguintes substâncias constituem exemplos de substâncias tóxicas de referência utilizadas com êxito em ensaios interlaboratoriais e em estudos de validação: lindano, trifluralina, pentaclorofenol, cloreto de cádmio e cloreto de potássio (1)(2)(5)(6)(13).

VALIDADE DO ENSAIO

10. Um ensaio é considerado válido se forem cumpridas as seguintes condições:

— a emergência nos controlos deve ser de, pelo menos, 70 % no final do ensaio (1)(6),

— a emergência de indivíduos adultos das espécies *C. riparius* e *C. yoshimatsui* nos recipientes de controlo deve ocorrer 12 a 23 dias após a inserção destas espécies nos recipientes; no caso da *C. tentans*, é necessário um período de 20 a 65 dias,

— no final do ensaio, devem determinar-se o pH e a concentração de oxigénio dissolvido em cada recipiente. A concentração de oxigénio deve ser de, pelo menos, 60 % do valor da saturação com ar (VSA) à temperatura utilizada e o pH da água sobrenadante deve estar compreendido entre 6 e 9, em todos os recipientes de ensaio,

▼M4

— a temperatura da água não deve variar mais de ± 1,0 °C. Esta temperatura pode ser controlada numa sala isotérmica, caso em que a temperatura ambiente deve ser confirmada a intervalos adequados.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Recipientes de ensaio

11. O estudo é realizado em copos de vidro de 600 ml, com 8 cm de diâmetro. Podem utilizar-se outros recipientes, devendo contudo assegurar-se uma espessura adequada da água sobrenadante e dos sedimentos. A superfície dos sedimentos deve proporcionar 2 a 3 cm^2 por cada larva. O rácio entre a espessura da camada de sedimentos e a espessura da água sobrenadante deve ser de 1:4. Os recipientes de ensaio e o restante equipamento que entre em contacto com o sistema de ensaio devem ser exclusivamente de vidro ou de outro material quimicamente inerte (p. ex., Teflon).

Seleção das espécies

12. A espécie a utilizar de preferência no ensaio é a *Chironomus riparius*. A espécie *Chironomus tentans* também é adequada, mas é mais difícil de manipular e exige um período de ensaio mais longo. Pode igualmente utilizar-se a *Chironomus yoshimatsui*. O apêndice 2 apresenta informações sobre os métodos de cultura de *Chironomus riparius*. Estão também disponíveis informações sobre as condições de cultura das espécies *Chironomus tentans* (4) e *Chironomus yoshimatsui* (11). A identidade das espécies deve ser confirmada antes do ensaio, exceto no caso de organismos provenientes de uma cultura interna do laboratório.

Sedimentos

13. Devem ser utilizados, de preferência, sedimentos formulados (reconstituídos, artificiais ou sintéticos). Contudo, se forem utilizados sedimentos naturais, estes devem ser caracterizados (pelo menos pH e teor de carbono orgânico, recomendando-se a determinação de outros parâmetros, tais como a razão C/N e a granulometria) e devem estar isentos de qualquer contaminação e de outros organismos que possam competir com os quironomídeos ou consumi-los. Recomenda-se igualmente que, antes de serem utilizados num ensaio de toxicidade em quironomídeos, os sedimentos naturais sejam acondicionados durante sete dias em condições semelhantes às do ensaio subsequente. Recomenda-se que sejam utilizados no presente ensaio (1)(15)(16) sedimentos formulados com a seguinte composição, baseada na do solo artificial utilizado no método C.8 (14):

a) 4-5 % (massa seca) de turfa: pH tão próximo quanto possível do intervalo 5,5-6,0; é importante utilizar turfa em pó, finamente moída (granulometria das partículas ≤ 1 mm), unicamente seca ao ar;

b) 20 % (massa seca) de argila caulinítica, de preferência com teor de caulinite superior a 30 %;

c) 75-76 % (massa seca) de areia quartzítica, com predominância de areia fina com mais de 50 % de partículas de granulometria compreendida entre 50 e 200 μm;

d) a quantidade de água desionizada necessária para que o teor de humidade da mistura final se situe na gama 30-50 %;

e) a quantidade de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) quimicamente puro necessária para ajustar o pH da mistura final dos sedimentos a 7,0 ± 0,5;

f) teor de carbono orgânico da mistura final: 2 % ± 0,5 %, devendo ser ajustado por recurso a quantidades adequadas de turfa e areia, em conformidade com as alíneas a) e c).

▼M4

14. As origens da turfa, da argila caulinítica e da areia devem ser conhecidas. Deve verificar-se a ausência de contaminação química (p. ex., metais pesados, compostos organoclorados, compostos organofosforados, etc.) nos componentes dos sedimentos. No apêndice 3, apresenta-se um exemplo de preparação de sedimentos. Uma mistura de componentes secos também é aceitável caso se demonstre que, após a adição da água sobrenadante, não ocorre separação de componentes dos sedimentos (por exemplo, partículas de turfa flutuantes) e que a turfa ou os sedimentos estão suficientemente acondicionados.

Água

15. Qualquer água com as características químicas de uma água de diluição aceitável enunciadas nos apêndices 2 e 4 é adequada para o ensaio. Para a cultura e o ensaio, pode utilizar-se qualquer água adequada, água natural (superficial ou subterrânea), água reconstituída (ver o apêndice 2) ou água da rede de abastecimento desclorada, desde que os quironomídeos nela sobrevivam durante todo o período de cultura e de ensaio sem evidenciarem sinais de *stress*. No início do ensaio, o pH da água de ensaio deve estar compreendido entre 6 e 9 e a dureza total da água, expressa em $CaCO_3$, não deve exceder 400 mg/l. No entanto, caso se suspeite de uma interação entre os iões responsáveis pela dureza e a substância em estudo, deve utilizar-se uma água de dureza inferior (nessa eventualidade, o meio Elendt M4 não pode ser utilizado). Deve utilizar-se o mesmo tipo de água em todo o estudo. As características de qualidade da água enumeradas no apêndice 4 devem ser determinadas pelo menos duas vezes por ano, ou sempre que se suspeite que tenham mudado significativamente.

Soluções-mãe — água enriquecida

16. As concentrações de ensaio são calculadas com base nas concentrações da água da coluna de água, ou seja, da água sobrenadante dos sedimentos. De um modo geral, as soluções de ensaio com as concentrações escolhidas são preparadas por diluição de uma solução-mãe. As soluções-mãe devem ser preparadas, de preferência, por dissolução da substância em estudo no meio de ensaio. Em alguns casos, pode ser necessária a utilização de solventes ou dispersantes para produzir uma solução-mãe com a concentração adequada. A acetona, o etanol, o metanol, os éteres mono e dimetílico do etilenoglicol, a dimetilformamida e o trietilenoglicol constituem exemplos de solventes que podem ser utilizados. No que respeita aos dispersantes, podem utilizar-se o Cremophor RH40, o Tween 80, a metilcelulose a 0,01 % e o HCO-40. A concentração do agente solubilizante no meio de ensaio final deve ser mínima (ou seja, $\leq$ 0,1 ml/l) e deve ser a mesma para todas as concentrações de exposição. Sempre que se utilize um agente solubilizante, este não deve apresentar efeitos significativos na sobrevivência das larvas de quironomídeos, nem efeitos adversos observáveis nas mesmas, a confirmar por meio de um controlo do solvente. No entanto, como se referiu acima, devem fazer-se todos os esforços para evitar utilizar tais produtos.

PLANEAMENTO DO ENSAIO

17. O planeamento do ensaio consiste na escolha do número e dos intervalos das concentrações de ensaio, do número de recipientes para cada concentração e do número de larvas por recipiente. Descreve-se de seguida o método de estimativa de pontos CE e do NOEC, bem como de realização de ensaios do limite. A análise por regressão linear é preferível à abordagem por testes de hipóteses.

Análise por regressão linear

18. As concentrações testadas no ensaio deverão incluir as concentrações às quais se observam efeitos (por exemplo, CE_{15} e CE_{50}) e abranger a gama de concentrações para as quais o efeito da substância em estudo é significativo. De modo geral, é possível melhorar a exatidão e, em especial, a validade das estimativas das concentrações que produzem efeitos (CE_x) se

▼M4

essas concentrações se situarem na gama de concentrações ensaiadas. Devem evitar-se extrapolações muito abaixo da concentração positiva mais baixa ou acima da concentração mais elevada. É útil efetuar um ensaio exploratório preliminar para a escolha da gama de concentrações a utilizar no ensaio (ver o ponto 27).

19. Caso se pretenda estimar uma CE_x, devem ser utilizados, pelo menos, cinco concentrações e três replicados de cada concentração. Em qualquer caso, para obter uma boa estimativa, é aconselhável ensaiar um número suficiente de concentrações. O fator entre as concentrações não deve ser superior a dois (salvo se a curva de resposta à dose tiver um declive reduzido). Pode reduzir-se o número de replicados de cada concentração se for aumentado o número de concentrações de ensaio com respostas diferentes. O aumento do número de replicados ou a redução dos intervalos entre concentrações intervalos produz, em geral, intervalos de confiança mais estreitos. Caso se pretenda estimar a sobrevivência e o crescimento das larvas a 10 dias, é necessário utilizar mais replicados.

Estimativa do NOEC/LOEC

20. Caso se pretenda estimar o NOEC ou o LOEC, devem ensaiar-se cinco concentrações com, pelo menos, quatro replicados, não devendo o fator entre as concentrações ser superior a dois. O número de replicados deverá ser suficiente para garantir a possibilidade estatística de detetar de forma adequada uma diferença de 20 % relativamente à concentração de controlo, com um grau de significância de 5 % (p = 0,05). No respeitante às taxas de desenvolvimento, é geralmente adequada uma análise de variância (ANOVA), como o teste de Dunnett ou o teste de Williams (17)(18)(19)(20). Quanto à taxa de emergência, podem utilizar-se o teste de Cochran-Armitage, o teste exato de Fisher (com a correção de Bonferroni) ou o teste de Mantel-Haentzal.

Ensaio do limite

21. Caso não sejam detetados efeitos no ensaio exploratório preliminar de seleção das concentrações, pode proceder-se a um ensaio do limite (uma concentração de ensaio e uma de controlo). O objetivo do ensaio do limite consiste em provar que as concentrações tóxicas da substância em estudo são superiores à concentração máxima ensaiada. No âmbito do presente método de ensaio, não é possível sugerir nenhuma concentração a recomendar; esse critério é deixado à apreciação das entidades regulamentadoras. Em geral, são necessários, pelo menos, seis replicados dos organismos expostos e de controlo. Deve comprovar-se existir a possibilidade estatística de detetar de forma adequada uma diferença de 20 % relativamente ao controlo, com um grau de significância de 5 % (p = 0,05). No que respeita ao efeito nas taxas de desenvolvimento e na massa, o teste *t* é um método estatístico adequado se os dados cumprirem os requisitos do teste (normalidade e variâncias homogéneas). Se estes requisitos não forem preenchidos, pode utilizar-se um teste *t* de variância desigual ou um teste não paramétrico, como o de Wilcoxon-Mann-Whithey. No que respeita à taxa de emergência, o teste exato de Fisher é adequado.

PROCEDIMENTO

Condições de exposição

Preparação do sistema água enriquecida-sedimentos

22. Coloca-se nos recipientes de ensaio quantidades adequadas de sedimentos formulados (ver os pontos 13-14 e o apêndice 3), de modo a formar uma camada com, pelo menos, 1,5 cm de espessura. Junta-se água numa espessura de 6 cm (ver o ponto 15). A razão entre a espessura da camada de sedimentos e a espessura da camada de água não deve exceder 1:4; a espessura da camada de sedimentos não deve exceder 3 cm. O sistema sedimentos-água deve ser sujeito a um arejamento ligeiro durante sete dias, antes da introdução dos organismos em estudo (ver o ponto 14 e o apêndice 3). Para evitar a separação de componentes dos sedimentos e a ressuspensão de materiais finos durante a criação da coluna de água, os sedimentos podem ser cobertos, enquanto a água é vertida, com um disco de plástico que se remove imediatamente depois. Podem também utilizar-se outros dispositivos.

▼M4

23. Os recipientes de ensaio devem ser cobertos (por exemplo, com placas de vidro). Se necessário, o nível inicial de água pode ser reposto durante o ensaio, para compensar a evaporação. Para tal, deve utilizar-se água destilada ou desionizada, de modo a evitar a acumulação de sais.

Introdução dos organismos em estudo

24. Quatro a cinco dias antes da introdução dos organismos em estudo nos recipientes de ensaio, deve colher-se aglomerados de ovos das culturas e colocá-los em pequenos recipientes com o meio de cultura. Pode utilizar-se meio proveniente da cultura-mãe ou um meio recentemente preparado. Neste último caso, importa adicionar ao meio de cultura uma pequena quantidade de alimentos, como, por exemplo, algas verdes e/ou algumas gotas de filtrado de uma suspensão de alimento para peixes finamente moído (ver o apêndice 2). Apenas devem ser utilizados aglomerados de ovos de postura recente. Normalmente, as larvas começam a eclodir alguns dias após a postura dos ovos (2 a 3 dias, a 20 °C, no caso das *Chironomus riparius*, e 1 a 4 dias no caso das *Chironomus tentans*, a 23 °C, e das *Chironomus yoshimatsui*, a 25 °C); o crescimento das larvas ocorre em quatro estádios larvares, cada um com a duração de 4 a 8 dias. Utilizar no ensaio larvas do primeiro estádio larvar (2-3 ou 1-4 dias após a eclosão). O estádio larvar dos insetos pode, eventualmente, ser verificado por exame da largura da cápsula cefálica (6).

25. Com o auxílio de uma pipeta embotada, coloca-se aleatoriamente vinte larvas do primeiro estádio larvar em cada recipiente de ensaio contendo os sedimentos e a água. O arejamento da água tem de ser suspenso durante a colocação das larvas nos recipientes de ensaio, assim permanecendo nas 24 horas subsequentes a esta operação (ver os pontos 24 e 32). Consoante o tipo de ensaio realizado (ver os pontos 19 e 20), o número de larvas por concentração deve ser, no mínimo, de 60, no caso de estimativas de pontos CE, e de 80, no caso das determinações de NOEC.

26. Vinte e quatro horas após a introdução das larvas, a coluna de água sobrenadante é enriquecida com a substância em estudo, retomando-se um arejamento ligeiro. Com o auxílio de uma pipeta, introduzem-se pequenos volumes da solução da substância em estudo abaixo da superfície da água. A água sobrenadante deve, em seguida, ser homogeneizada com cuidado, para não perturbar os sedimentos.

Concentrações de ensaio

27. Pode ser útil efetuar um ensaio exploratório para a determinação da gama de concentrações a utilizar no ensaio definitivo. Para o efeito, recorre-se a uma série de concentrações espaçadas da substância em estudo. Garantido que a densidade de quironomídeos por unidade de superfície seja idêntica à utilizada no ensaio definitivo, os quironomídeos são expostos a cada concentração da substância em estudo por um período que permita uma estimativa das concentrações de ensaio adequadas, não sendo necessários replicados.

28. As concentrações a utilizar no ensaio definitivo são decididas com base nos resultados do ensaio exploratório. Devem ser utilizadas pelo menos cinco concentrações, selecionadas do modo descrito nos pontos 18 a 20.

Controlos

29. Deve utilizar-se no ensaio um número adequado de recipientes de controlo sem a substância em estudo, mas com os sedimentos (ver os pontos 19-20). Caso se recorra a um solvente para a incorporação da substância em estudo (ver o ponto 16), deve efetuar-se um controlo utilizando sedimentos com solvente.

▼M4

Sistema de ensaio

30. São utilizados sistemas estáticos. Em casos excecionais, pode utilizar-se sistemas semiestáticos ou sistemas de escoamento com renovação intermitente ou contínua da água sobrenadante, por exemplo, se as características de qualidade da água se tornarem inadequadas ao organismo em estudo ou afetarem o equilíbrio químico (isto é, se os teores de oxigénio dissolvido baixarem demasiado, se a concentração de produtos de excreção aumentar demasiado, se ocorrer lixiviação de minerais dos sedimentos que afete o pH e/ou dureza da água, etc.). Deve preferir-se, contudo, o recurso a outros métodos para melhorar a qualidade da água sobrenadante, como o arejamento, que é, em geral, suficiente.

Alimentação

31. É necessário alimentar as larvas, de preferência diariamente ou, no mínimo, três vezes por semana. Utilizar alimento para peixes (suspensão em água ou finamente moído, por exemplo, Tetra Min or Tetra-Phyll; ver pormenores no apêndice 2); a quantidade de 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg no caso de *C. yoshimatsui*) por larva e dia afigura-se adequada para as larvas jovens, nos primeiros 10 dias. Após este período, pode ser necessária uma quantidade ligeiramente superior: 0,5-1 mg por larva e dia deve bastar para o resto do ensaio. A ração alimentar deve ser reduzida a todos os organismos expostos e aos controlos caso se observe crescimento fúngico ou se verifique mortalidade nos controlos. Se não for possível impedir o crescimento fúngico, deve repetir-se o ensaio. Quando se estuda substâncias fortemente adsorventes (por exemplo, com log K_{ow} > 5) ou substâncias ligadas aos sedimentos por ligações covalentes, a quantidade de alimentos necessária para assegurar a sobrevivência e o crescimento natural dos organismos pode ser adicionada aos sedimentos formulados, antes do período de estabilização. Para esse fim, devem ser utilizados matérias vegetais em vez de alimentos para peixes; a título de exemplo, 0,5 % (massa seca) de folhas finamente moídas de espécies como a urtiga comum (*Urtica dioeca*), a amoreira (*Morus alba*), o trevo branco (*Trifolium repens*), o espinafre (*Spinacia oleracea*) ou outras matérias de origem vegetal (*Cerophyl* ou α-celulose).

Condições de incubação

32. O arejamento ligeiro da água sobrenadante nos recipientes de ensaio deve iniciar-se, de preferência, 24 horas após a introdução das larvas, prosseguindo ao longo de todo o ensaio (deve evitar-se que a concentração de oxigénio dissolvido baixe para valores inferiores a 60 % do VSA). O arejamento é efetuado por intermédio de uma pipeta de Pasteur de vidro, fixada 2-3 cm acima da camada de sedimentos (caudal: uma ou poucas bolhas por segundo). No ensaio de produtos químicos voláteis, pode optar-se por não arejar o sistema sedimentos-água.

33. O ensaio é realizado a temperatura constante (20 °C ± 2 °C). No caso das espécies *C. tentans* e *C. yoshimatsui*, as temperaturas recomendadas são 23 °C e 25 °C (± 2 °C), respetivamente. Utiliza-se um período de irradiação de 16 horas, com uma intensidade luminosa de 500 a 1 000 lux.

Duração da exposição

34. A exposição começa com a introdução das larvas nos recipientes enriquecidos e nos recipientes de controlo. A duração máxima da exposição é de 28 dias para a *C. riparius* e a *C. yoshimatsui* e de 65 dias para a *C. tentans*. Se os insetos emergirem precocemente, pode pôr-se termo ao ensaio, no mínimo, cinco dias após a emergência do último indivíduo adulto nos recipientes de controlo.

OBSERVAÇÕES

Emergência

35. Determina-se o tempo de desenvolvimento e o número total de insetos machos e fêmeas totalmente emergidos. Os machos são facilmente identificados pelas suas antenas plumosas.

▼M4

36. Os recipientes de ensaio devem ser observados pelo menos três vezes por semana, a fim de apreciar visualmente qualquer comportamento anormal (por exemplo, saída dos sedimentos, natação anormal) em relação aos recipientes de controlo. Durante o período de emergência previsto, é necessário proceder à contagem diária dos insetos emergidos. O sexo e o número de insetos totalmente emergidos são registados diariamente. Após a identificação, removem-se os insetos dos recipientes. Quaisquer aglomerados de ovos postos antes do termo do ensaio devem ser registados e, de seguida, removidos, para evitar a reintrodução de larvas nos sedimentos. Regista-se também o número de ninfas visíveis que não emergiram. O apêndice 5 contém orientações sobre a mensuração da emergência.

Crescimento e sobrevivência

37. Se for necessário obter dados sobre a sobrevivência e o crescimento das larvas em dez dias, deve prever-se recipientes de ensaio suplementares desde o início, para que possam ser utilizados posteriormente. Os sedimentos destes recipientes são passados por um crivo com abertura de malha de 250 μm, para reter as larvas. Os critérios de morte são a imobilidade e a ausência de reação a estímulos mecânicos. As larvas não recuperadas devem também ser contadas como mortas (as larvas que morreram no início do ensaio podem ter sido degradadas por micróbios). Determina-se a massa seca, isenta de cinzas, de larvas sobreviventes em cada recipiente de ensaio, calculando-se a massa seca média por recipiente. É útil determinar o estádio larvar das larvas sobreviventes; para tal, pode recorrer-se à medição da largura da cápsula cefálica de cada indivíduo.

Determinações analíticas

Concentração da substância em estudo

38. No início (de preferência uma hora após a aplicação da substância) e no final do ensaio, é necessário analisar, no mínimo, amostras da água sobrenadante, da água dos poros e dos sedimentos correspondentes à concentração mais elevada e a uma concentração inferior. Estas determinações da concentração da substância em estudo proporcionam informações sobre o comportamento e/ou a partição da mesma no sistema água-sedimentos. A colheita de amostras dos sedimentos no início do ensaio pode influenciar o sistema (por exemplo, remoção de larvas), pelo que devem ser utilizados recipientes de ensaio adicionais para a realização das determinações analíticas no início e durante o ensaio, se pertinente (ver o ponto 39). Pode não ser necessário efetuar medições nos sedimentos, caso a partição da substância em estudo entre a água e os sedimentos tenha sido claramente determinada num estudo em condições comparáveis (por exemplo, coeficiente de partição sedimentos/água, tipo de aplicação, teor de carbono orgânico dos sedimentos).

39. Quando se efetua medições intermédias (por exemplo, no 7.º dia) e a análise necessita de amostras grandes que não podem ser colhidas dos recipientes de ensaio sem influenciar o sistema em estudo, as determinações analíticas devem ser realizadas com amostras colhidas de recipientes de ensaio suplementares tratados da mesma forma (incluindo a presença dos organismos em estudo), mas que não são alvo de observações biológicas.

40. A centrifugação a cerca de 10 000 g e 4 ºC, durante 30 minutos, é o procedimento recomendado para isolar a água intersticial. No entanto, caso se demonstre que a substância em estudo não é adsorvida aos filtros, a filtragem também é aceitável. Em alguns casos, se a amostra for demasiado pequena, poderá não ser possível analisar concentrações na água dos poros.

▼M4

Parâmetros físico-químicos

41. O pH, o teor de oxigénio dissolvido na água e a temperatura dos recipientes de ensaio devem ser medidos de forma adequada (ver o ponto 10). A dureza e o ião amónio devem ser medidos nos recipientes de controlo e num recipiente de ensaio com a concentração mais elevada, no início e no final do ensaio.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

42. O objetivo deste ensaio consiste em determinar o efeito da substância em estudo nas taxas de desenvolvimento e no número total de insetos machos e fêmeas totalmente emergidos ou, no caso dos ensaios de 10 dias, os efeitos na sobrevivência e no peso das larvas. Se não houver indicação de sensibilidades estatisticamente diferentes entre os sexos, os resultados relativos aos machos e às fêmeas podem ser agrupados para efeitos de análise estatística. As diferenças de sensibilidade entre os sexos podem ser avaliadas estatisticamente, por exemplo, recorrendo a um ensaio de tabela de contingência χ^2-r x 2. Se necessário, determina-se a sobrevivência das larvas e a massa seca por recipiente após 10 dias.

43. As concentrações com efeitos, expressas em relação à água sobrenadante, são calculadas de preferência a partir das concentrações medidas nos sedimentos no início do ensaio (ver o ponto 38).

44. Para efetuar uma estimativa pontual do valor CE_{50} ou de qualquer valor CE_x, podem equiparar-se os dados estatísticos por recipiente aos de ensaios idênticos reais. No cálculo de um intervalo de confiança para qualquer valor CE_x, importa ter em conta a variabilidade entre recipientes, ou deve demonstrar-se que essa variabilidade é tão reduzida que pode ser ignorada. Se o modelo for ajustado pelo método dos mínimos quadrados, deve aplicar-se uma transformação aos dados estatísticos por recipiente, para melhorar a homogeneidade da variância. Contudo, os valores de CE_x só devem ser calculados após retransformação da resposta no valor original.

45. Se a análise estatística tiver por objetivo determinar o NOEC/LOEC utilizando hipóteses estatísticas, importa ter em conta a variabilidade entre recipientes, por exemplo, aplicando um método ANOVA hierarquizado. Se não se verificarem os pressupostos comuns do método ANOVA, testes mais robustos podem constituir uma alternativa adequada (21).

Taxa de emergência

46. As taxas de emergência são dados de "tudo ou nada", que podem ser analisados através de um teste de Cochran-Armitage aplicado de forma regressiva, nos casos em que se prevê uma relação monótona entre a dose fornecida e a resposta e os dados são compatíveis com a previsão. Caso contrário, pode recorrer-se a um teste exato de Fisher ou a um teste de Mantel-Haentzal com valores *p* ajustados segundo o método de Bonferroni-Holm. Se, para a mesma concentração, houver indícios de uma maior variabilidade entre replicados do que a sugerida por uma distribuição binomial (frequentemente referida como variação "extrabinomial"), deve utilizar-se um teste exato de Fisher ou um teste de Cochran-Armitage robusto, como proposto na referência 21.

47. Determina-se a soma dos insetos emergidos por recipiente, ne, que é seguidamente dividida pelo número de larvas nele introduzidas, na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

em que:

ER = Taxa de emergência

n_e = Número de insetos emergidos no recipiente

n_a = Número de larvas introduzidas no recipiente

48. Uma alternativa mais adequada a amostras grandes, quando se regista variância extrabinomial, consiste em considerar a taxa de emergência uma resposta contínua e aplicar procedimentos como o teste de William, caso se preveja uma relação monótona entre a dose fornecida e a resposta, compatível com os dados de taxa de emergência em causa. Por seu turno, o teste de Dunnett é adequado aos casos em que não se regista uma relação monótona. Neste contexto, uma amostra "grande" é definida como aquela em que o número total de insetos emergidos e não emergidos é superior a cinco por replicado (recipiente).

49. A aplicação de métodos ANOVA implica que os valores de taxa de emergência sejam sujeitos a uma transformação de arco-seno da raiz quadrada ou a uma transformação de Tukey-Freeman, de forma a obter uma distribuição aproximadamente normal e uniformizar as variâncias. Os testes de Cochran-Armitage, exato de Fisher (Bonferroni) e Mantel-Haentzal podem ser aplicados quando se utilizam frequências absolutas. A transformação de arco-seno da raiz quadrada consiste em calcular o inverso do seno ($\sin^{-1}$) da raiz quadrada do valor da taxa de emergência.

50. No respeitante às taxas de emergência, os valores de CE_x são calculados por análise de regressão — por exemplo, por recurso aos modelos *probit* (22), *logit* ou Weibull ou a programas informáticos comerciais adequados). Em caso de fracasso da análise de regressão (por exemplo, se o número de respostas parciais for inferior a dois), utilizam-se outros métodos não paramétricos, como a média móvel ou a simples interpolação.

Taxa de desenvolvimento

51. O tempo médio de desenvolvimento representa o tempo médio decorrido entre a introdução das larvas (dia 0 do ensaio) e a emergência da coorte experimental de insetos (para o cálculo do tempo de desenvolvimento real, é necessário ter em conta a idade das larvas no momento da introdução). A taxa de desenvolvimento é o inverso do tempo de desenvolvimento (unidade: 1/dia) e representa a quantidade de desenvolvimento larvar que ocorre por dia. A taxa de desenvolvimento é o parâmetro preferido para a avaliação destes estudos de toxicidade dos sedimentos, dado que a sua variância é mais baixa que a do tempo de desenvolvimento, sendo também mais homogénea e mais próxima da distribuição normal. Os testes paramétricos mais potentes estão mais adaptados à taxa de desenvolvimento do que ao tempo de desenvolvimento. Considerando a taxa de desenvolvimento uma resposta contínua, os valores de CE_x podem ser estimados por recurso a uma análise de regressão – por exemplo, como descrito em 23 e 24.

52. No contexto dos testes estatísticos que se seguem, considera-se que o número de insetos observado no dia de inspeção x emergiu no ponto médio do intervalo de tempo compreendido entre o dia x e o dia x-d (d = duração do intervalo de inspeção, em geral 1 dia). A taxa de desenvolvimento média por recipiente (é calculada com base nas seguintes equações:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

em que:

$\bar{x}$: Taxa de desenvolvimento média por recipiente

i: Índice do intervalo de inspeção

m: Número máximo de intervalos de inspeção

▼M4

f_i: Número de insetos emergidos no intervalo de inspeção *i*

n_e: Número de insetos emergidos no final do ensaio ($= \sum f_i$)

x_i: Taxa de desenvolvimento dos insetos emergidos no intervalo *i*

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

em que:

dia_i: Dia de inspeção (n.º de dias decorridos desde a introdução dos organismos)

d_i: Duração do intervalo de inspeção *i* (dias, normalmente 1 dia)

Relatório dos ensaios

53. O relatório dos ensaios deve incluir, no mínimo, as seguintes informações:

Substância em estudo:

— natureza física e, quando pertinente, propriedades físico-químicas (solubilidade na água, pressão de vapor, coeficiente de partição no solo — ou nos sedimentos, se disponível —, estabilidade em água, etc.),

— dados de identificação química (denominação comum, denominação química, fórmula estrutural, número CAS, etc.), incluindo o grau de pureza e o método analítico de quantificação da substância.

Espécies utilizadas nos ensaios:

— animais: espécie, nome científico, origem dos organismos e condições de reprodução,

— informações sobre o manuseamento dos aglomerados de ovos e das larvas,

— idade dos animais quando introduzidos nos recipientes de ensaio.

Condições experimentais:

— sedimentos utilizados, isto é, de origem natural ou formulados,

— no caso dos sedimentos naturais, localização e descrição do local de colheita, incluindo, se possível, o historial de contaminação; características: pH, teor de carbono orgânico, razão C/N e granulometria (se pertinente),

— preparação dos sedimentos formulados: ingredientes e características (teor de carbono orgânico, pH, humidade, etc., no início dos ensaios),

— preparação da água para os ensaios, caso seja utilizada água reconstituída, e respetivas características (concentração de oxigénio, pH, condutividade, dureza, etc., no início dos ensaios);

— espessura dos sedimentos e da água sobrenadante,

— volume de água sobrenadante e de água dos poros; massa do sedimento húmido com e sem a água dos poros,

— recipientes de ensaio (material e dimensões),

— método de preparação das soluções-mãe e concentrações de ensaio,

▼M4

— aplicação da substância em estudo: concentrações de ensaio utilizadas, número de replicados e solvente utilizado, se for o caso,

— condições de incubação: temperatura, ciclo de luz e intensidade luminosa, arejamento (frequência e intensidade),

— informações pormenorizadas sobre a alimentação dos organismos, incluindo o tipo de alimentos, a preparação, a quantidade e o regime alimentar.

Resultados:

— concentrações de ensaio nominais, concentrações de ensaio medidas e resultados de todas as análises efetuadas para determinar a concentração da substância em estudo nos recipientes de ensaio,

— qualidade da água nos recipientes de ensaio (pH, temperatura, oxigénio dissolvido, dureza e teor de ião amónio),

— renovação da água evaporada nos ensaios, se for o caso,

— número de insetos machos e fêmeas emergidos por recipiente e dia,

— número de larvas que não originaram insetos, por recipiente,

— massa seca média de larvas por recipiente e, se for caso disso, por estádio larvar,

— percentagem de emergência por replicado e por concentração de ensaio (machos e fêmeas no seu conjunto),

— taxa média de desenvolvimento de insetos totalmente emergidos por replicado e por concentração de ensaio (machos e fêmeas no seu conjunto),

— estimativas de parâmetros de toxicidade, como, por exemplo, CE_x (e os intervalos de confiança associados), NOEC e/ou LOEC, e métodos estatísticos utilizados para a determinação dos mesmos,

— discussão dos resultados, incluindo qualquer influência nos resultados do ensaio decorrente de alterações efetuadas ao presente método de ensaio.

REFERÊNCIAS:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Editado por M. Streloke e H. Köpp. Berlim, 1995.

(2) Fleming R. *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. Agosto de 1994. WRc, Reino Unido.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. WOSTA Workshop realizado nos Países Baixos.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. p. 1125-1241. *In* ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International. West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. Dezembro de 1997.

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Segunda edição. EPA 600/R-99/064. Março de 2000. Revisão da primeira edição, de junho de 1994.

▼M4

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., Kirby R.S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontário, Canadá.

(10) Sugaya Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. *Jp. J. Sanit. Zool.* 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). *Jp. J. Sanit. Zool.* 37(1): 47-57.

(12) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. Setembro de 1995.

(14) Capítulo C.8 deste anexo: Toxicidade em relação às minhocas.

(15) Suedel B.C., Rodgers J.H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1163-1175.

(16) Naylor C., Rodrigues C. (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. *Chemosphere* 31: 3291-3303.

(17) Dunnett C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statis. Assoc.* 50: 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.

(19) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.

(20) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510-531.

(21) Rao J.N.K., Scott A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48:577-585.

(22) Christensen E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213-221.

(23) Bruce, Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494.

(24) Slob W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.

▼**M4**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

No âmbito do presente método, aplica-se as seguintes definições:

Sedimentos formulados ou reconstituídos, artificiais ou sintéticos: mistura de matérias utilizadas para simular os componentes físicos de sedimentos naturais.

Água sobrenadante: água situada acima da superfície dos sedimentos, no recipiente de ensaio.

Água intersticial ou água dos poros: água que ocupa o espaço entre as partículas de sedimentos e de solo.

Água enriquecida: água utilizada no ensaio, à qual foi adicionada a substância em estudo.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

▼M4

Apêndice 2

Recomendações para a cultura de *Chironomus riparius*

1. As larvas de *Chironomus* podem ser criadas em caixas de cristalização ou recipientes de maiores dimensões. Espalha-se no fundo do recipiente areia quartzítica fina de modo a constituir uma camada fina com 5 a 10 mm de espessura. Verificou-se que o *kieselguhr* (p. ex. Merck 8117) é também um substrato adequado; neste caso, pode utilizar-se uma camada mais fina, da ordem de poucos milímetros. Adiciona-se de seguida uma coluna de vários centímetros de uma água adequada. Se necessário, os níveis de água podem ser repostos para compensar a evaporação e evitar a dessecação. A água pode ser substituída, se necessário. Deve efetuar-se um arejamento ligeiro. Os recipientes de criação das larvas devem ser mantidos em gaiolas adequadas, de forma a evitar fugas de adultos emergentes. A gaiola deve ser suficientemente grande (no mínimo, cerca de 30 x 30 x 30 cm), para permitir a enxameação dos adultos emergidos, sem o que poderá não ocorrer copulação.

2. As gaiolas devem ser mantidas à temperatura ambiente ou a uma temperatura constante de 20 ± 2 °C, com um período de luminosidade (cerca de 1 000 lux) de 16 horas e oito horas de escuridão. Existem referências documentais de que um teor de humidade relativa do ar inferior a 60 % pode impedir a reprodução.

Água de diluição

3. Pode utilizar-se qualquer água natural ou reconstituída adequada. Utiliza-se em geral água de poços, água da rede de abastecimento desclorada e meios artificiais (por exemplo, meio Elendt M4 ou M7; ver abaixo). A água tem de ser arejada antes da utilização. Se necessário, a água das culturas pode ser renovada por vazamento ou sifonagem cuidadoso da água dos recipientes de cultura, para não destruir os tubos das larvas.

Alimentação das larvas

4. As larvas de *Chironomus* são alimentadas com cerca de 250 mg por recipiente e por dia de um alimento floculado para peixes (Tetra Min®, Tetra Phyll® ou outra marca semelhante). Os alimentos podem ser administrados na forma de um pó seco finamente moído ou de uma suspensão em água: adicionar 1,0 g de alimento floculado a 20 ml de água de diluição e misturar de modo a obter uma mistura homogénea. Esta preparação pode ser administrada ao caudal aproximado de 5 ml por recipiente e por dia (agitar antes da utilização). Pode administrar-se às larvas de idade superior uma maior quantidade de alimento.

5. A alimentação é ajustada em função da qualidade da água. Se o meio de cultura se tornar turvo, deve reduzir-se a alimentação. A administração de alimentos deve ser objeto de um registo minucioso. A escassez de alimentos causaria a migração das larvas para a coluna de água, enquanto uma alimentação demasiado rica aumentaria a atividade microbiana e reduziria a concentração de oxigénio. Ambas estas condições podem resultar numa redução das taxas de crescimento.

6. Ao preparar novos recipientes de cultura, podem também adicionar-se algumas células de algas verdes (por exemplo, *Scenedesmus subspicatus* e *Chlorella vulgaris*).

Alimentação dos adultos emergidos

7. Alguns experimentadores sugeriram que um tampão de algodão embebido numa solução saturada de sacarose pode servir de alimento para os adultos emergidos.

▼M4

Emergência

8. À temperatura de 20 ± 2 °C, os adultos começam a emergir dos recipientes de criação das larvas decorridos 13 a 15 dias. Os machos são facilmente distinguidos pelas suas antenas plumosas.

Aglomerados de ovos

9. Quando se encontrarem presentes adultos nas gaiolas de criação, deve verificar-se três vezes por semana se ocorre a deposição de aglomerados gelatinosos de ovos nos recipientes de criação das larvas. Se tal suceder, devem ser removidos com cuidado e ser transferidos para uma pequena cápsula com uma amostra da água de incubação. Os aglomerados de ovos são utilizados para iniciar novas culturas noutros recipientes (p. ex., 2-4 aglomerados de ovos por recipiente) ou em ensaios de toxicidade.

10. As larvas do primeiro estádio larvar devem eclodir decorridos 2-3 dias.

Preparação de novos recipientes de cultura

11. Quando as culturas estiverem estabelecidas, deverá ser possível preparar um novo recipiente de cultura de larvas por semana, ou com uma frequência menor (consoante os requisitos dos ensaios), removendo os recipientes mais antigos após a emergência dos insetos adultos. O recurso a este sistema permitirá obter um aprovisionamento regular de insetos adultos com uma gestão mínima.

Preparação das soluções de ensaio M4 e M7

12. O meio M4 foi descrito por Elendt (1990). O meio M7 é preparado do mesmo modo que o M4, exceto no que respeita às substâncias indicadas no quadro 1, cujas concentrações são quatro vezes inferiores às do meio M4. Encontra-se em preparação um artigo sobre o meio M7 (Elendt, comunicação pessoal). A solução de ensaio não deve ser preparada em conformidade com as indicações de Elendt e Bias (1990), dado as concentrações de NaSiO3.5H2O, NaNO3, KH2PO4 e K2HPO4 apresentadas para a preparação das soluções-mãe não serem adequadas.

Preparação do meio M7

13. Cada solução-mãe (I) é preparada individualmente, sendo preparada uma solução-mãe combinada (II) a partir dessas soluções (I) (ver o quadro 1). O meio M7 é preparado diluindo para 1 l, com água desionizada, 50 ml da solução-mãe combinada (II) e as quantidades de cada solução-mãe de macronutrientes indicadas no quadro 2. Prepara-se uma solução-mãe de vitaminas juntando três vitaminas a água desionizada, como indicado no quadro 3; adiciona-se 0,1 ml da solução-mãe combinada de vitaminas ao meio M7 final pouco antes da utilização (a solução-mãe de vitaminas é armazenada por congelação, em pequenas alíquotas). O meio é arejado e estabilizado.

Quadro 1

Soluções-mãe de elementos vestigiais para os meios M4 e M7

Soluções-mãe (I)	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Para preparar a solução-mãe combinada (II), misturar as seguintes quantidades (ml) de soluções-mãe (I) e diluir para 1 litro com água desionizada		Concentrações finais nas soluções de ensaio (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Soluções-mãe (I)	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Para preparar a solução-mãe combinada (II), misturar as seguintes quantidades (ml) de soluções-mãe (I) e diluir para 1 litro com água desionizada		Concentrações finais nas soluções de ensaio (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Estas substâncias são diferentes nos meios M4 e M7, como se indica no quadro.
(2) Estas soluções são preparadas individualmente, misturadas e colocadas de imediato numa autoclave.

Quadro 2

Soluções-mãe de macronutrientes para os meios M4 e M7

	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Quantidade de soluções-mãe de macronutrientes adicionada para preparar os meios M4 e M7 (ml/l)	Concentrações finais nas soluções de ensaio M4 e M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Quadro 3

Soluções-mãe de vitaminas para os meios M4 e M7

As três soluções de vitaminas são combinadas para originar uma única solução-mãe.

	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Quantidade de solução-mãe de vitaminas adicionada para preparar os meios M4 e M7 (ml/l)	Concentrações finais nas soluções de ensaio M4 e M7 (mg/l)
Cloridrato de tiamina	750	0,1	0,075
Cianocobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotina	7,5	0,1	0,00075

REFERÊNCIAS

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Editado por M. Streloke e H. Köpp. Berlim, 1995.

Elendt B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P., Bias W.-R. (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Apêndice 3

PREPARAÇÃO DOS SEDIMENTOS FORMULADOS

Composição dos sedimentos

A composição dos sedimentos formulados deve ser a seguinte:

Componente	Características	% da massa seca dos sedimentos
Turfa	Turfa de *Sphagnum*, com pH tão próximo quanto possível do intervalo 5,5-6,0, sem restos visíveis de plantas, finamente moída (granulometria ≤ 1 mm) e seca ao ar	4-5
Areia quartzítica	Granulometria: > 50 % das partículas de granulometria na gama 50-200 μm	75-76
Argila caulinítica	Teor de caulinite ≥ 30 %	20
Carbono orgânico	Ajustado por adição de turfa e areia	2 (±0,5)
Carbonato de cácio	$CaCO_3$ pulverizado quimicamente puro	0,05-0,1
Água	Condutividade ≤ 10 μS/cm	30-50

Preparação

A turfa é seca ao ar e moída até se obter um pó fino. Prepara-se uma suspensão da quantidade necessária de turfa pulverizada em água desionizada, por recurso a um dispositivo de homogeneização de alta eficiência. O pH desta suspensão é ajustado para 5,5 ± 0,5 com $CaCO_3$. A suspensão é acondicionada durante, pelo menos, dois dias, com agitação ligeira a 20 ± 2 °C, para estabilizar o pH e estabelecer um perfil microbiano estável. Findo este período, determina-se novamente o pH, que deve ser de 6,0 ± 0,5. A suspensão de turfa é então misturada com os outros componentes (areia e argila caulinítica) e água desionizada, de forma a obter sedimentos homogéneos com um teor de água da ordem de 30 %--50 % da massa seca dos sedimentos. O pH da mistura final é determinado uma vez mais e, se necessário, ajustado para 6,5-7,5 com $CaCO_3$. São colhidas amostras dos sedimentos para determinar o resíduo seco e o teor de carbono orgânico. Recomenda-se que, antes de ser utilizados num ensaio de toxicidade em quironomídeos, os sedimentos formulados sejam acondicionados durante sete dias em condições idênticas às do ensaio subsequente.

Armazenagem

Os componentes secos para a preparação dos sedimentos artificiais podem ser armazenados num local seco e fresco, à temperatura ambiente. Os sedimentos formulados (húmidos) não devem ser armazenados antes da sua utilização nos ensaios. Devem ser utilizados imediatamente após o período de acondicionamento de sete dias que conclui a sua preparação.

REFERÊNCIAS:

Capítulo C.8 deste anexo: Toxicidade em relação às minhocas.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

▼**M4**

Apêndice 4

Características químicas de uma água de diluição adequada

Substância	Concentrações
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amoníaco não ionizado	< 1 µg/l
Dureza expressa em $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Cloro residual	< 10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	< 50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados e dos bifenilos policlorados, totais	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

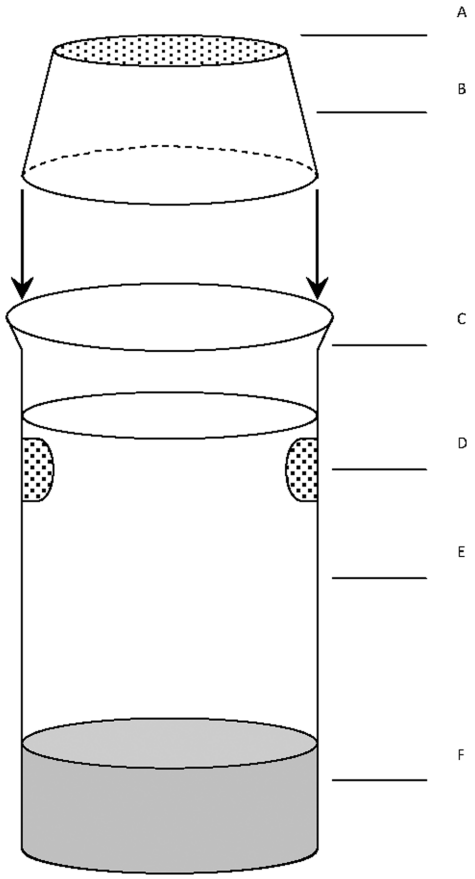
(*) Contudo, caso se suspeite da existência de uma interação entre os iões responsáveis pela dureza e a substância em estudo, deve utilizar-se uma água mais macia (nesse caso, o meio Elendt M4 não pode ser utilizado).

▼**M4**

Apêndice 5

Orientações para a monitorização da emergência das larvas de quironomídeos

Os copos de ensaio são munidos de armadilhas de emergência. Estas armadilhas são necessárias a partir do vigésimo dia, até ao final do ensaio. A título de exemplo, pode utilizar-se o dispositivo abaixo ilustrado:



A: tela de nylon

B: copo de plástico invertido

C: copo de exposição sem bico

D: aberturas recobertas, para renovação da água

E: água

F: sedimentos

▼M4

C.29. BIODEGRADABILIDADE "FÁCIL" — CO_2 EM RECIPIENTES FECHADOS (Ensaio do espaço livre)

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 310 da OCDE (2006). Consiste num método exploratório para a avaliação da biodegradabilidade "fácil" dos produtos químicos e proporciona informações semelhantes às dos seis métodos de ensaio descritos no capítulo C.4 do presente anexo (A a F). Assim, um produto químico com resultados positivos neste método de ensaio pode ser considerado facilmente biodegradável e, por conseguinte, rapidamente degradável no ambiente.

2. O método do dióxido de carbono (CO_2) (1), que se encontra bem implantado, baseia-se no ensaio original de Sturm (2) para a avaliação da biodegradabilidade de produtos químicos orgânicos através da medição do dióxido de carbono produzido pela ação microbiana e tem constituído, em geral, a primeira opção para o ensaio de produtos químicos pouco solúveis e de produtos químicos muito adsorventes. É também aplicado a produtos químicos solúveis (mas não voláteis), uma vez que a libertação de dióxido de carbono é frequentemente considerada a única prova inequívoca de atividade microbiana. A remoção do carbono orgânico dissolvido pode ter lugar por processos físico-químicos, como a adsorção, a volatilização, a precipitação e a hidrólise, bem como pela ação microbiana e por muitas reações não biológicas que consomem oxigénio; o CO_2 raramente é produzido a partir de produtos químicos orgânicos por via abiótica. Nos ensaios original e modificado de Sturm (1)(2), o CO_2 é removido da fase líquida para os recipientes de absorção por borbulhamento, no meio líquido, de ar tratado com o objetivo de remover o CO_2; na versão de Larson (3)(4), é transferido do recipiente de reação para os absorventes introduzindo um fluxo de ar isento de CO_2 no espaço livre acima da superfície ("*headspace*"), com agitação contínua do recipiente de ensaio. O recipiente só é agitado no caso da modificação de Larson; a agitação é prescrita, apenas para produtos químicos insolúveis, na norma ISO 9439 (5) e na versão original dos EUA (6), que preconizam ambas o borbulhamento em vez da substituição do ar no espaço livre acima da superfície. Em outro método oficial da EPA — Estados Unidos da América (7) —, que se baseia no método de Gledhill (8), o recipiente de reação, sob agitação, encontra-se estanque e o CO_2 produzido é recolhido, diretamente a partir da fase gasosa, num coletor interno com uma substância alcalina, como nos respirómetros clássicos de Warburg/Barcroft.

3. Contudo, no caso da aplicação do ensaio de Sturm modificado a vários produtos químicos (9), demonstrou-se que, durante o ensaio, se acumula no meio carbono inorgânico (CI). Na degradação de 20 mg C/l de anilina, por exemplo, observou-se uma concentração de carbono inorgânico da ordem de 8 mg/l. Assim, a recolha de CO_2 em coletores com substâncias alcalinas traduz a quantidade real daquele gás produzida microbiologicamente nas fases intermédias da degradação. Por conseguinte, a exigência de mais de 60 % da produção máxima teórica de CO_2 (CO_2Te) ser recolhida nos dez dias imediatamente após ser alcançado um nível de 10 % de biodegradação ("período de dez dias"), para que um produto químico seja classificado de facilmente biodegradável, não é cumprida no caso de alguns produtos químicos, que teriam essa classificação utilizando como critério a remoção do carbono orgânico dissolvido (COD).

4. Se a percentagem de degradação for inferior ao previsto, ter-se-á possivelmente acumulado carbono inorgânico na solução de ensaio. A biodegradabilidade pode, então, ser avaliada por recurso aos outros ensaios de biodegradabilidade "fácil".

▼M4

5. Outros inconvenientes do método de Sturm (complexidade, morosidade, propensão para a ocorrência de erros experimentais e impossibilidade de aplicação a produtos químicos voláteis) tinham já levado à procura de uma técnica com recipientes selados diversa da de Gledhill, sem fluxo de gás (10)(11). Boatman *et al.* (12) analisaram os métodos mais antigos e adotaram um sistema fechado com libertação de CO_2 no espaço livre no final da incubação, por acidificação do meio. O CO_2 foi determinado através da análise do carbono inorgânico por cromatografia em fase gasosa a partir de amostras colhidas automaticamente no espaço livre, sem ter em conta o carbono inorgânico dissolvido (CID) na fase líquida. Além disso, foram utilizados recipientes muito pequenos (20 ml), com apenas 10 ml de meio, o que causou problemas, por exemplo, ao adicionar as quantidades necessariamente muito reduzidas de produtos químicos insolúveis e/ou no caso da inexistência ou insuficiência, no meio inoculado, de microrganismos para a degradação dos produtos químicos em estudo.

6. Essas dificuldades foram superadas pelos estudos independentes de Struijs e Stoltenkamp (13) e de Birch e Fletcher (14), sendo os destes últimos inspirados pela experiência dos autores com dispositivos utilizados em ensaios de biodegradação anaeróbia (15). No método dos primeiros (13), o CO_2 é determinado no espaço livre após acidificação e equilíbrio, enquanto no segundo método (14) é determinado o carbono inorgânico dissolvido das fases gasosa e líquida, sem tratamento; mais de 90 % do carbono inorgânico formado encontra-se na fase líquida. Ambos os métodos têm vantagens relativamente ao ensaio de Sturm, na medida em que o sistema de ensaio é mais compacto e mais gerível, podem estudar-se produtos químicos voláteis e evita-se a possibilidade de demoras na determinação do CO_2 produzido.

7. Ambas as abordagens foram combinadas na norma ISO com a referência 16, que foi sujeita a um ensaio interlaboratorial (17) e constitui a base do presente método de ensaio. O método da EPA dos Estados Unidos da América (18) utiliza também as duas abordagens. Foram recomendados dois métodos de determinação do CO_2, designadamente a determinação no espaço livre após acidificação (13) e a determinação do carbono inorgânico na fase líquida após adição de um agente alcalino em excesso. Este último método foi introduzido por Peterson, no decurso do ensaio interlaboratorial da CONCAWE (19) do presente método de espaço livre modificado para determinar biodegradabilidades intrínsecas. As alterações introduzidas na revisão de 1992 dos métodos do capítulo C.4 deste anexo, relativos à determinação da biodegradabilidade "fácil" (20), foram incorporadas no presente método de ensaio, pelo que, além disso, as condições (meio, duração, etc.) são as mesmas que as do ensaio de Sturm revisto (20). Birch e Fletcher (14) referiram ter obtido com este ensaio de espaço livre resultados muito semelhantes aos obtidos, para os mesmos produtos químicos, no ensaio interlaboratorial dos métodos de ensaio revistos promovido pela OCDE (21).

PRINCÍPIO DO MÉTODO

8. O produto químico em estudo, em geral na concentração de 20 mg C/l, que constitui a única fonte de carbono e energia, é incubado num tampão de sais minerais previamente inoculado com uma população mista de microrganismos. O ensaio é realizado em recipientes selados, com ar no espaço livre acima do líquido, que proporciona uma reserva de oxigénio para a biodegradação aeróbia. A libertação de CO_2 resultante da biodegradação aeróbia total do produto químico em estudo é determinada pela medição do excesso de carbono inorgânico produzido nos recipientes de ensaio relativamente ao produzido em recipientes de ensaio em branco que contêm apenas o meio inoculado. A extensão da biodegradação é expressa em percentagem da produção máxima teórica de carbono inorgânico (CITe), com base na quantidade de produto químico em estudo, expressa em carbono orgânico, inicialmente adicionada.

9. Pode também determinar-se (20) a remoção de COD e/ou o grau de biodegradação primária do produto químico em estudo.

▼M4

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

10. Para o cálculo da percentagem de degradação, é necessário conhecer o teor de carbono orgânico (% ponderal) do produto químico em estudo, quer a partir da sua estrutura química quer por análise. No caso dos produtos químicos voláteis, o conhecimento da constante da lei de Henry, por medição ou cálculo, é útil para determinar uma razão adequada entre o espaço livre e o volume de líquido. É útil dispor de informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo para os microrganismos, a fim de selecionar as concentrações de ensaio adequadas e para interpretar resultados de baixa biodegradabilidade: recomenda-se a realização de controlos de inibição, exceto se se souber que o produto químico não inibe a atividade microbiana (ver o ponto 24).

APLICABILIDADE DO MÉTODO

11. O ensaio é aplicável a produtos químicos solúveis e insolúveis em água, embora deva assegurar-se uma boa dispersão do produto químico. Utilizando a proporção recomendada de 1:2 entre o espaço livre e o volume de líquido, podem utilizar-se produtos químicos voláteis com uma constante da lei de Henry não superior a 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$, dado que a percentagem do produto químico no espaço livre não excederá 1 % (13). Pode utilizar-se um volume menor de espaço livre no ensaio de produtos químicos mais voláteis, cuja biodisponibilidade possa ser um fator limitante, em especial se forem pouco solúveis em água. No entanto, os utilizadores devem assegurar que a razão entre o espaço livre e o volume de líquido, bem como a concentração do produto químico, proporcionam uma quantidade suficiente de oxigénio para permitir a biodegradação aeróbia completa, evitando, por exemplo, o recurso a uma concentração elevada de substrato e a um espaço livre reduzido. As referências (13) e (23) contêm orientações nesta matéria.

PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA

12. A fim de verificar o procedimento, deve submeter-se a ensaio, em paralelo, uma substância de referência de biodegradabilidade conhecida. Para o efeito, a anilina, o benzoato de sódio e o etilenoglicol podem ser utilizados com produtos químicos solúveis em água, podendo utilizar-se o 1-octanol no caso de produtos químicos pouco solúveis (13). A biodegradação destes produtos químicos deve ser superior a 60 % do carbono inorgânico teórico, em 14 dias.

REPRODUTIBILIDADE

13. No ensaio interlaboratorial do método, promovido pela ISO (17), foram obtidos os seguintes resultados utilizando as condições recomendadas, nomeadamente uma concentração do produto químico em estudo de 20 mg C/l.

Produto químico	Percentagem média de biodegradação (28 dias)	Coeficiente de variação (%)	Número de laboratórios
Anilina	90	16	17
1-Octanol	85	12	14

Com anilina, a variabilidade interna dos ensaios (indicador de replicabilidade) foi reduzida, não excedendo os coeficientes de variabilidade 5 % em quase todas as séries de ensaios. Nos dois casos em que a replicabilidade foi pior, a variabilidade mais elevada deveu-se provavelmente à elevada produção de carbono inorgânico nos ensaios em branco. Com 1-octanol, registou-se uma replicabilidade mais baixa, embora com variabilidade inferior a 10 % em 79 % das séries de ensaios. Esta maior variabilidade interna dos ensaios pode ter sido devida a erros de dosagem, dado que foi necessário injetar um pequeno volume (3 a 4 μl) de 1-octanol nos recipientes de ensaio selados. Obtém-se coeficientes de variação superiores quando se utilizam concentrações mais baixas do produto químico em estudo, nomeadamente inferiores a 10 mg C/l. Este problema pode ser parcialmente superado reduzindo a concentração de carbono inorgânico total (CIT) no inóculo.

▼M4

14. Num ensaio interlaboratorial promovido pela UE (24) de cinco produtos químicos tensioativos adicionadas na concentração de 10 mg C/l, foram obtidos os seguintes resultados:

Produto químico	Percentagem média de biodegradação (28 dias)	Coeficiente de variação (%)	Número de laboratórios
Benzenossulfonato de tetra-propileno	17	45	10
Di-iso-octilssulfosuccinato (aniónico)	72	22	9
Cloreto de hexadeciltrimetil-amónio (*) (catiónico)	75	13	10
$(Etoxilato)_9$ de isononilfenol (não iónico)	41	32	10
Amidopropil de coco-dimetil-hidroxissulfo-betaína (anfotérico)	60	23	11

(*) Adicionou-se SiO_2 para neutralizar a toxicidade.

Os resultados mostram que, de um modo geral, a variabilidade foi superior no caso dos tensioativos menos degradados. A variabilidade interna dos ensaios foi inferior a 15 % em mais de 90 % dos casos; o maior valor registado foi da ordem de 30 % a 40 %.

NOTA: Na sua maioria, os tensioativos não são espécies moleculares simples, mas misturas de isómeros, homólogos, etc., com tempos de degradação característicos diferentes e constantes cinéticas diferentes, que produzem curvas mal definidas e atenuadas. Poderá, portanto, não ser possível atingir o limiar de 60 % no período de 10 dias, embora cada espécie molecular ultrapasse esse valor em 10 dias se for ensaiada isoladamente. Este facto também pode ser observado com outras misturas complexas.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Equipamento

15. Material corrente de laboratório, nomeadamente:

a) frascos de soro de vidro, selados com rolhas de borracha butílica e cápsulas de alumínio. A capacidade recomendada é "125 ml", a que corresponde um volume total de cerca de 160 ml (neste caso, o volume de cada frasco deve ser comprovadamente de 160 ± 1 ml). Se os resultados satisfizerem as condições descritas nos pontos 66 e 67, pode utilizar-se recipientes de capacidade inferior;

b) analisador de carbono ou outro instrumento (p. ex. cromatógrafo de gás) para a determinação do carbono inorgânico;

▼M4

c) seringas de elevada precisão para amostras gasosas e líquidas;

d) agitador orbital num ambiente com controlo de temperatura;

e) fonte de ar isento de CO_2 — este ar pode ser preparado fazendo passar uma corrente de ar por grânulos de cal sodada ou utilizando uma mistura gasosa com 80 % N_2/20 % 0_2 (opcional) (ver o ponto 28);

f) dispositivo de filtração com membrana de porosidade 0,20-0,45 μm (opcional);

g) analisador de carbono orgânico (opcional).

Reagentes

16. Utilizar reagentes de qualidade analítica em todo o processo.

Água

17. Deve utilizar-se água destilada ou desionizada com teor de carbono orgânico total não superior a 1 mg/l. Este valor não excede 5 % do teor de carbono orgânico inicial introduzido pela dose recomendada do produto químico em estudo.

Soluções-mãe para o meio de sais minerais

18. As soluções-mãe e o meio de sais minerais são semelhantes aos utilizados nos ensaios ISO 14593 (16) e C.4 ("Biodegradabilidade 'fácil'") (20). A utilização de uma concentração mais elevada de cloreto de amónio (2,0 g/l em vez de 0,5 g/l) só é necessária em casos muito excecionais, por exemplo, se a concentração do produto químico em estudo exceder 40 mg de C/l. As soluções-mãe devem ser armazenadas com refrigeração e eliminadas após seis meses (ou antes, se existirem indícios de precipitação ou de crescimento microbiano). Preparar as seguintes soluções-mãe:

a) di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) 8,50g

hidrogenofosfato de dipotássio (K_2HPO_4) 21,75g

hidrogenofosfato de dissódio di-hidratado ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40g

cloreto de amónio (NH_4Cl) 0,50g

Dissolver em água e ajustar para 1 litro. O pH desta solução deve ser de 7,4 (± 0,2). Se tal não for o caso, preparar uma solução nova;

b) cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40g

Dissolver em água e ajustar para 1 litro;

c) sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50g

Dissolver em água e ajustar para 1 litro;

d) cloreto de ferro (III) hexa-hidratado ($FeCl_3.6H_20$) 0,25g

Dissolver em água e ajustar para 1 litro, adicionando de seguida uma gota de ácido concentrado.

Preparação do meio de sais minerais

19. Dissolver 10 ml de solução (a) em cerca de 800 ml de água (ponto 17), adicionando de seguida 1 ml das soluções (b), (c) e (d), e ajustar o volume para 1 litro com água (ponto 17).

Outros reagentes

20. Ácido ortofosfórico (H_3PO_4) concentrado (> 85 %, em massa por volume).

▼M4

Solução de hidróxido de sódio 7 M

21. Dissolver 280 g de hidróxido de sódio (NaOH) em 1 litro de água (ponto 17). Determinar a concentração de carbono inorgânico dissolvido da solução e ter em conta este valor no cálculo do resultado do ensaio (ver os pontos 55 e 61), nomeadamente à luz do critério de validade que consta do ponto 66, alínea b). Se a concentração de carbono inorgânico dissolvido for demasiado elevada, preparar uma solução nova.

Produto químico em estudo

22. Preparar uma solução-mãe de um produto químico suficientemente hidrossolúvel, em água (ponto 17) ou no meio de ensaio (ponto 19), a uma concentração de preferência 100 vezes superior à concentração final a utilizar no ensaio; pode ser necessário ajustar o pH da solução-mãe. Esta solução deve ser adicionada ao meio mineral, de modo a obter uma concentração final de carbono orgânico compreendida entre 2 e 40 mg C/l (de preferência 20 mg C/l). A utilização de concentrações inferiores a estas pode comprometer a precisão dos resultados. Os produtos químicos líquidos solúveis e insolúveis podem ser diretamente introduzidos nos recipientes por meio de seringas de alta precisão. Os produtos químicos pouco solúveis e insolúveis podem exigir um tratamento especial (25). As opções nesta matéria são as seguintes:

a) adição direta de quantidades pesadas conhecidas;

b) dispersão por meio de ultrassons antes da adição;

c) dispersão com o auxílio de agentes emulsionantes, sendo necessário determinar antes da adição se os mesmos têm efeitos inibidores ou estimulantes da atividade microbiana;

d) adsorção do produto químico líquido, ou de uma solução num solvente volátil adequado, num meio ou suporte inerte (por exemplo, filtro de fibra de vidro), seguida de evaporação do solvente, se utilizado, e adição direta de quantidades conhecidas;

e) colocação no recipiente de ensaio vazio de um volume conhecido de uma solução do produto químico em estudo num solvente muito volátil, seguida de evaporação do solvente.

É necessário verificar se os agentes ou solventes utilizados nas alíneas c), d) e e) têm efeitos estimulantes ou inibidores da atividade microbiana — ver o ponto 42, alínea b).

Produto químico de referência

23. Preparar uma solução-mãe do produto químico (solúvel) de referência em água (ponto 17), com uma concentração, de preferência, 100 vezes superior à concentração final a utilizar no ensaio (20 mg C/l).

Verificação da inibição

24. Frequentemente, os produtos químicos estudados não sofrem degradação significativa nas condições utilizadas nas avaliações de biodegradabilidade "fácil". Uma das causas possíveis deste facto reside no efeito inibidor, para o inóculo, do produto químico em estudo, às concentrações em que é utilizado no ensaio. A verificação da inibição pode ser incluída no procedimento de ensaio, para facilitar a identificação (*a posteriori*) da inibição como causa possível ou fator contribuinte. A verificação da inibição também permite excluir essas interferências e demonstrar que a ausência de degradação ou a ocorrência de uma degradação ligeira é apenas atribuível a condições de ensaio pouco propícias à ação microbiana. A fim de obter informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo para microrganismos (aeróbios), preparar uma solução, no meio de ensaio, do produto químico em estudo e do produto químico de referência (ponto 19), cada um nas concentrações utilizadas no ensaio (ver os pontos 22 e 23).

▼M4

Inóculo

25. O inóculo pode ter várias origens: lamas ativadas, efluentes de águas residuais (não clorados), águas de superfície e solos ou uma mistura destes (20). A atividade de biodegradação da fonte do inóculo deve ser verificada por recurso a um produto químico de referência. Independentemente da fonte, não devem ser utilizados microrganismos anteriormente expostos ao produto químico em estudo para ensaios de determinação da biodegradabilidade "fácil".

Atenção: As lamas ativadas, e as águas residuais ou os efluentes de águas residuais, contêm organismos patogénicos, pelo quem devem ser manipulados com cuidado.

26. De acordo com a experiência adquirida, o volume ótimo de inóculo satisfaz as seguintes condições:

— é suficiente para proporcionar uma atividade de biodegradação adequada,

— degrada o produto químico de referência na percentagem estabelecida (ver o ponto 66),

— origina 10^2 a 10^5 unidades formadoras de colónias por mililitro, na mistura final,

— origina, em geral, uma concentração de 4 mg/l de sólidos em suspensão na mistura final quando se utilizam lamas ativadas; é possível utilizar concentrações até 30 mg/l, que podem, contudo, aumentar significativamente a produção de CO_2 nos ensaios em branco (26),

— representa menos de 10 % da concentração inicial de carbono orgânico introduzida pelo produto químico em estudo,

— é, geralmente, da ordem de 1-10 ml por litro de solução de ensaio.

Lamas ativadas

27. As lamas ativadas são recolhidas do frasco no tanque de arejamento de uma estação de tratamento de águas residuais, ou unidade à escala laboratorial, que trate essencialmente esgotos domésticos. Se necessário, as partículas grosseiras devem ser removidas por crivagem (p. ex., através de um crivo de malha de 1 mm^2); as lamas devem ser mantidas em condições aeróbias até à sua utilização.

28. Em alternativa, após a remoção das partículas grosseiras eventualmente presentes, deixar sedimentar ou centrifugar (por exemplo, a 1 100 g durante 10 minutos). Remover o líquido sobrenadante. As lamas podem ser lavadas na solução de sais minerais. Preparar uma suspensão das lamas concentradas no meio de sais minerais, de forma a obter uma concentração de 3-5 g de sólidos em suspensão/l. Proceder de seguida ao arejamento enquanto for necessário.

29. As lamas devem ser obtidas numa estação de tratamento convencional em bom estado de funcionamento. Se forem obtidas numa estação de tratamento de débito elevado ou se nelas se admitir a presença de inibidores, devem ser lavadas. Após obter uma mistura homogénea, deixar sedimentar ou centrifugar as lamas repostas em suspensão, rejeitar o sobrenadante e preparar nova suspensão das lamas lavadas num novo volume de meio de sais minerais. Repetir este procedimento até que as lamas possam considerar-se isentas de substrato em excesso ou de inibidor.

30. Quando a nova suspensão estiver preparada, ou no caso de se utilizarem lamas não tratadas, colher uma amostra imediatamente antes da utilização, para determinar a massa seca dos sólidos em suspensão.

31. A homogeneização das lamas ativadas (3-5 g de sólidos em suspensão/l) constitui uma alternativa. Tratar as lamas num misturador de Waring durante dois minutos, a velocidade média. Deixar sedimentar a mistura de lamas durante 30 minutos ou, se necessário, por um período mais longo, e decantar o líquido, para utilização das lamas como inóculo na proporção de 10 mg/l de meio de sais minerais.

▼M4

32. É possível obter uma redução ainda maior do CO_2 libertado no ensaio em branco através do arejamento das lamas durante a noite com ar isento de CO_2. Utilizar como inóculo no presente ensaio 4 mg de sólidos das lamas ativadas por litro (13).

Efluente secundário de águas residuais

33. Em alternativa, o inóculo pode ser colhido num efluente secundário de uma estação de tratamento, ou unidade à escala laboratorial, que trate essencialmente esgotos domésticos. Manter a amostra em condições aeróbias e utilizar no dia da colheita, ou efetuar um pré-acondicionamento, se necessário. Deve utilizar-se um filtro para remover as partículas grosseiras do efluente, determinando-se também o pH.

34. Para reduzir o teor de carbono inorgânico do filtrado, borbulha-se neste ar isento de CO_2 — ponto 15, alínea e) — durante 1 h, mantendo o pH a 6,5 com o auxílio de ácido ortofosfórico (ponto 20). O pH inicial é reposto com o auxílio de uma solução de hidróxido de sódio (ponto 21); após sedimentação durante cerca de 1 h, toma-se uma alíquota do sobrenadante para inoculação. Este procedimento permite reduzir o teor de carbono inorgânico do inóculo. Por exemplo, quando se utiliza como inóculo o volume máximo recomendado de efluente filtrado borbulhado (100 ml) por litro, a quantidade de carbono inorgânico presente nos recipientes de ensaio em branco é da ordem de 0,4 a 1,3 mg/l (14), o que representa 2 % a 6,5 % do carbono do produto químico em estudo, relativamente a uma concentração de 20 mg C/l, e 4 % a 13 %, relativamente a uma concentração de 10 mg C/l.

Águas de superfície

35. Colher uma amostra de uma água de superfície adequada. A amostra deve ser mantida em condições aeróbias e ser utilizada no dia da colheita. Se necessário, deve ser concentrada por filtração ou centrifugação. O volume de inóculo a utilizar em cada recipiente de ensaio deve satisfazer as condições enunciadas no ponto 26.

Solos

36. Colhe-se uma amostra de um solo adequado, a uma profundidade não superior a 20 cm. Deve remover-se da amostra pedras, restos vegetais e invertebrados, após o que a amostra é peneirada através de uma malha de 2 mm (se a amostra estiver demasiado húmida para ser peneirada de imediato, secá-la parcialmente ao ar para facilitar a operação). A amostra deve ser mantida em condições aeróbias e ser utilizada no dia da colheita (se for transportada num saco de polietileno negro não hermético, pode ser armazenada nesse saco, a uma temperatura de 2 a 4 °C, pelo período máximo de um mês).

Pré-acondicionamento do inóculo

37. Os inóculos podem ser pré-acondicionados para as condições experimentais, mas não podem ser pré-adaptados ao produto químico em estudo. O pré-acondicionamento pode reduzir a libertação de CO_2 nos recipientes de ensaio em branco. A operação consiste em arejar as lamas ativadas, durante cinco a sete dias, com ar húmido isento de CO_2, à temperatura de ensaio, após diluição para 30 mg/l no meio de ensaio.

PROCEDIMENTO

Número de frascos

38. O número de frascos — ponto 15, alínea a) — necessários depende da frequência das análises e da duração do ensaio.

39. Recomenda-se a análise de frascos em triplicado após um número suficiente de períodos, de modo a permitir a identificação do período de 10 dias. Devem também analisar-se, pelo menos, cinco frascos — ponto 15, alínea a) — das séries a), b) e c) (ver o ponto 42), no final do ensaio, para permitir o cálculo de intervalos de confiança de 95 % para a percentagem média de biodegradação.

▼M4

Meio inoculado

40. O inóculo é utilizado numa concentração de 4 mg de sólidos secos de lamas ativadas por litro. Preparar, imediatamente antes da utilização, uma quantidade suficiente de meio inoculado, por exemplo, adicionando 2 ml de lamas ativadas sujeitas a um tratamento adequado (pontos 27 a 32), à concentração de 2 000 mg/l, a 1 litro de meio de sais minerais (ponto 19). Se forem utilizados efluentes secundários de águas residuais, adicionar 100 ml de efluente (ponto 33) a 900 ml de meio de sais minerais (ponto 19) e diluir para 1 litro com o meio.

Preparação dos frascos

41. Coloca-se alíquotas de meio inoculado em séries de frascos replicados, de forma a obter uma proporção espaço livre/líquido de 1:2 (colocar, por exemplo, 107 ml em frascos de 160 ml de capacidade). Pode utilizar-se outras proporções, atendendo, contudo, às recomendações que constam do ponto 11. Qualquer que seja o tipo de inóculo utilizado, deve assegurar-se que o meio inoculado está devidamente homogeneizado, tendo em vista a sua distribuição uniforme nos frascos de ensaio.

42. Prepara-se as seguintes séries de frascos – ponto 15, alínea a):

a) recipientes de ensaio (assinalados por F_T), que contêm o produto químico em estudo;

b) recipientes de ensaio em branco (assinalados por F_B) que contêm apenas o meio de ensaio e o inóculo; devem adicionar-se também quaisquer produtos químicos, solventes, agentes ou filtros de fibra de vidro utilizados para a introdução do produto químico em estudo nos recipientes de ensaio;

c) recipientes para controlo do processo (assinalados por F_C), que contêm o produto químico de referência;

d) se necessário, recipientes destinados à verificação do possível efeito inibidor do produto químico em estudo (assinalados por F_I), que contêm este e o produto químico de referência nas mesmas concentrações que, respetivamente, os frascos F_T e F_C (ponto 24);

e) recipientes (assinalados por F_S) destinados à verificação da possível degradação abiótica, preparados como descrito na alínea a), mas contendo, além disso, 50 mg/l de $HgCl_2$ ou esterilizados por outros meios (por exemplo, tratamento em autoclave).

43. Os produtos químicos em estudo e de referência hidrossolúveis são adicionados na forma de soluções-mãe aquosas (pontos 22, 23 e 24), de modo a obter uma concentração de 10 a 20 mg C/l.

44. Os produtos químicos em estudo e de referência insolúveis em água são introduzidos nos frascos de diversas formas — ver o ponto 22, alíneas a)-e) —, consoante a sua natureza, antes ou depois da adição do meio inoculado, em função do método de tratamento do produto químico em estudo. Se for utilizado um dos métodos indicados no ponto 22, alíneas a) a e), os frascos F_B — ponto 42, alínea b) — devem ser tratados de forma idêntica, mas sem o produto químico em estudo e o produto químico de referência.

45. Os produtos químicos em estudo voláteis devem ser injetados nos frascos selados (ponto 47) com o auxílio de uma microsseringa. A dose é calculada com base no volume injetado e na densidade do produto.

46. Quando necessário, deve acrescentar-se água aos recipientes, de forma que o volume de líquido seja idêntico em todos eles. Deve garantir-se que a razão entre o espaço livre e o volume de líquido (geralmente 1:2), bem como a concentração do produto químico em estudo, sejam tais que a quantidade de oxigénio presente no espaço livre seja suficiente para permitir a biodegradação completa.

▼M4

47. Seguidamente, todas as garrafas são seladas, por exemplo, com rolhas de borracha butílica e cápsulas de alumínio. Os produtos químicos em estudo voláteis devem ser introduzidos nesta fase (ponto 45). Caso se pretenda monitorizar o decréscimo da concentração de COD da solução de ensaio e efetuar análises da concentração inicial de carbono inorgânico — controlos "estéreis"; ponto 42, alínea e) — ou outras determinações, colher uma amostra adequada do recipiente de ensaio. O recipiente de ensaio e o seu conteúdo são, em seguida, eliminados.

48. Os frascos selados são colocados num agitador rotativo — ponto 15, alínea d) —, com uma agitação suficiente para manter o conteúdo homogeneizado e em suspensão (por exemplo, 150 a 200 rpm), e incubados, no escuro, à temperatura de 20 °C ± 1 °C.

Amostragem

49. O padrão de amostragem depende do período de latência e da taxa cinética de biodegradação do produto químico em estudo. Retiram-se frascos para análise no dia da colheita de amostras, que deve ocorrer, pelo menos, uma vez por semana, ou, caso se pretenda obter uma curva de degradação completa, com uma frequência superior (por exemplo, duas vezes por semana). Retira-se do agitador o número necessário de frascos replicados, designadamente F_T, F_B e F_C e, se for caso disso, F_I e F_S (ver o ponto 42). O ensaio prolonga-se, geralmente, por 28 dias. Se a curva de biodegradação exibir um patamar antes do 28.º dia, o ensaio pode ser concluído. Colher, para análise, amostras dos cinco frascos reservados para o 28.º dia e utilizar os resultados para calcular os limites de confiança ou o coeficiente de variação da percentagem de biodegradação. Os frascos respeitantes ao controlo da inibição e da degradação abiótica não necessitam de amostragem tão frequente quanto os restantes frascos; basta colher amostras no 1.º e no 28.º dia.

Análise do carbono inorgânico

50. A produção de CO_2 nos frascos é determinada através da medição do aumento da concentração de carbono inorgânico (CI) durante a incubação. Recomendam-se dois métodos para a medição da quantidade de carbono inorgânico produzida no ensaio, que se descrevem a seguir. Dado que os métodos podem conduzir a resultados ligeiramente diferentes, deve ser utilizado apenas um deles por série de ensaios.

51. O método a) é recomendado se for provável que o meio contenha resíduos, nomeadamente, de filtros de fibra de vidro e/ou de produtos químicos em estudo insolúveis. Caso não se disponha de um analisador de carbono, esta análise poderá ser realizada por recurso a um cromatógrafo em fase gasosa. É importante que os frascos se encontrem à temperatura de ensaio, ou a uma temperatura próxima desta, quando se procede à análise do gás presente no espaço livre. O método b) pode ser de utilização mais fácil para os laboratórios que utilizam analisadores de carbono para determinar o carbono inorgânico. É importante que a solução de hidróxido de sódio (ponto 21) utilizada para converter o CO_2 em carbonato seja preparada na altura ou que o seu teor de carbono inorgânico seja conhecido, a fim de que este parâmetro possa ser tido em conta no cálculo dos resultados dos ensaios — ver o ponto 66, alínea b).

Método a): acidificação a pH < 3

52. Antes de efetuar cada série de análises, o analisador de carbono inorgânico é calibrado utilizando uma substância com um teor-padrão de carbono inorgânico — por exemplo, mistura a 1 % (m/m) de CO_2 em N_2. Injeta-se ácido ortofosfórico concentrado (ponto 20) através do septo de cada frasco de amostra, de forma a reduzir o pH do meio para menos de 3 (adicionar, por exemplo, 1 ml a 107 ml de meio de ensaio). Os frascos são então recolocados no agitador. Após agitação durante uma hora à temperatura de ensaio, os frascos são removidos do agitador, colhendo-se alíquotas (por exemplo, 1 ml) de gás no espaço livre de cada frasco, que se injetam no analisador de carbono inorgânico. As concentrações de carbono inorgânico são registadas em mg C/l.

▼M4

53. O princípio deste método reside em que, após acidificação a pH < 3 e equilíbrio a 20 °C, a constante de partição do CO_2 entre as fases gasosa e líquida nos frascos de ensaio, determinada em termos de concentração, ser de 1,0 (13). Este facto deve ser comprovado, para o sistema de ensaio, pelo menos uma vez, do seguinte modo:

Preparar frascos com teores de carbono inorgânico de 5 e 10 mg/l, por recurso a uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) anidro em água isenta de CO_2, preparada por acidificação de água a pH 6,5 com ácido ortofosfórico concentrado (ponto 20), na qual se fez borbulhar, de um dia para o outro, ar isento de CO_2, e se neutralizou depois o pH com álcalis. Assegurar que a proporção entre o espaço livre e o volume de líquido é a mesma que nos ensaios (por exemplo, 1:2). Acidificar e deixar estabilizar do modo descrito no ponto 52, determinando de seguida as concentrações de carbono inorgânico no espaço livre e na fase líquida. Verificar se as concentrações são iguais, dentro dos limites do erro experimental. Se não forem, o operador deve reexaminar os procedimentos. Não é necessário verificar em cada ensaio a partição do carbono inorgânico entre as fases gasosa e líquida. A verificação pode, em geral, ser efetuada aquando da calibração.

54. Caso se pretenda determinar a remoção do COD (apenas no caso de produtos químicos solúveis em água), devem colher-se amostras da fase líquida de frascos distintos (não acidificados), que são filtradas por uma membrana e injetadas no analisador de COD. Estes frascos podem ser utilizados para outras análises, consoante necessário, com o objetivo de determinar a biodegradação primária.

Método b): ***conversão de CO_2 a carbonato***

55. Antes de cada série de análises, o analisador de carbono inorgânico é calibrado com um padrão adequado — por exemplo, uma solução de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) em água isenta de CO_2 (ver o ponto 53), na gama de concentrações de carbono inorgânico de 0 a 20 mg/l. Injeta-se através do septo de cada frasco no qual se colhe uma amostra uma solução de hidróxido de sódio 7 M (ponto 21) — por exemplo, 1 ml em 107 ml de meio —, sendo esses frascos agitados durante 1 h à temperatura de ensaio. Utilizar a mesma solução de NaOH em todos os frascos retirados num determinado dia, mas não obrigatoriamente em todas as colheitas destas amostras ao longo do ensaio. Se forem necessários valores absolutos de concentrações de carbono inorgânico das amostras em branco quando de todas as colheitas de amostras, é necessário determinar o teor de carbono inorgânico da solução de NaOH em cada utilização. Remover os frascos em causa do agitador e colocá-los em repouso. Retirar com uma seringa volumes adequados (por exemplo, 50 a 1 000 µl) da fase líquida de cada frasco. Injetar as amostras no analisador de carbono inorgânico, registando as concentrações deste obtidas. Deve assegurar-se que o aparelho é adequado às amostras alcalinas produzidas no presente método.

56. O princípio do método reside em que, após a adição de solução alcalina e a agitação, o teor de carbono inorgânico no espaço livre é insignificante. Este facto deve ser comprovado para cada sistema de ensaio pelo menos uma vez, por recurso a padrões de carbono inorgânico, mediante a adição de uma solução alcalina, estabilização e a determinação da concentração de carbono inorgânico no espaço livre e nas fases líquidas (ver o ponto 53). A concentração no espaço livre deve ser praticamente nula. Não é necessário verificar a absorção quase completa do CO_2 em cada ensaio.

57. Caso se pretenda determinar a remoção do COD (apenas no caso de produtos químicos solúveis em água), devem colher-se amostras da fase líquida de frascos distintos sem solução alcalina adicionada, que são filtradas por uma membrana e injetadas no analisador de COD. Estes frascos podem ser utilizados para outras análises, consoante necessário, com o objetivo de determinar a biodegradabilidade primária.

▼M4

DADOS E RELATÓRIOS

Cálculo dos resultados

58. Pressupondo que a mineralização do produto químico em estudo em CO_2 é de 100 %, o teor de carbono inorgânico teórico (CITe) superior ao produzido nos frascos de ensaio em branco é igual ao COT adicionado a cada frasco no início dos ensaios, isto é:

$$CITe = COT.$$

A massa total (mg) de carbono inorgânico (CIT) em cada frasco é:

$$\begin{aligned} CIT &= (\text{mg C na fase líquida} + \text{mg C no espaço livre}) \\ &= (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \end{aligned} \qquad \text{Equação 1}$$

em que:

V_L = volume de líquido no frasco (litros);

C_L = concentração de carbono inorgânico no líquido (mg/l, expressa em carbono);

V_H = volume do espaço livre (litros);

C_H = concentração de carbono inorgânico no espaço livre (mg/l, expressa em carbono).

O cálculo do CIT em ambos os métodos de análise utilizados para a determinação do carbono inorgânico no presente ensaio é descrito nos pontos 60 e 61. A percentagem de biodegradação (*% D*), em ambos os casos, é dada por:

$$\%\ D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{Equação 2}$$

em que:

CIT_t = mg de CIT no frasco de ensaio, no instante *t*;

CIT_b = mg de CIT (em média) nos frascos de ensaio em branco, no instante *t*;

COT = mg de COT almente no recipiente de ensaio.

A percentagem de biodegradação (% D) é calculada para os frascos de ensaio (F_T), de referência (F_C) e, caso tenham sido incluídos, de controlo da inibição (F_I), com base nas quantidades respetivas de CIT produzidas até ao instante da colheita de cada amostra.

59. Caso se observe um aumento significativo do teor de CIT nos frascos de controlo estéreis (F_S) no período de ensaio, pode concluir-se ter ocorrido degradação abiótica do produto químico em estudo, devendo este facto ser tido em conta no cálculo do parâmetro D na equação 2.

Acidificação para pH < 3

60. Uma vez que a acidificação para pH < 3 e o posterior equilíbrio resultam na uniformização da concentração de carbono inorgânico total nas fases gasosa e líquida, apenas é necessário determinar a concentração de carbono inorgânico na fase gasosa. Aplica-se a equação 1 $CIT = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, em que V_B é o volume do frasco de soro.

Conversão do CO_2 em carbonato

61. No presente método, os cálculos são realizados como na equação 1, sem ter em conta a quantidade insignificante de carbono inorgânico na fase gasosa, ou seja, $V_H \times C_H = 0$ e $CIT = V_L \times C_L$.

▼M4

Expressão dos resultados

62. A curva de biodegradação é obtida através da representação gráfica da percentagem de biodegradação (D) em função do tempo de incubação, indicando-se, se possível, a fase de latência, a fase de degradação, o período de 10 dias e a fase de patamar, que é a fase na qual já se atingiu a degradação máxima e a curva de biodegradação estabilizou. Se forem obtidos resultados comparáveis (diferença inferior a 20 %) para os recipientes de ensaio em paralelo, F_T, representa-se graficamente uma curva média (ver o apêndice 2, figura 1); se tal não for o caso, representam-se as curvas relativas a cada recipiente. Determina-se o valor médio da percentagem de biodegradação na fase de patamar ou identifica-se o valor mais elevado da mesma (por exemplo, quando a curva começa a infletir, na fase de patamar), mas, neste último caso, é importante verificar se o valor em causa não é anómalo. No relatório dos ensaios, este nível máximo de biodegradação deve ser expresso como "grau de biodegradação do produto químico em estudo". Se o número de recipientes de ensaio se tiver revelado insuficiente para definir uma fase de patamar, utilizam-se os dados determinados no último dia do ensaio para calcular um valor médio. Este valor (média de cinco replicados), serve de indicador da precisão de determinação da percentagem de biodegradação. Indicar também o valor obtido no final do período de 10 dias.

63. Representar, do mesmo modo, a curva correspondente ao produto químico de referência (F_C), bem como, se for caso disso, a curva relativa ao controlo da eliminação abiótica (F_S) e a curva relativa ao controlo da inibição (F_I).

64. Registar os teores de carbono inorgânico total presentes nos ensaios em branco (F_B), bem como, se for caso disso, os teores de CIT presentes nos frascos F_S (controlo da eliminação abiótica).

65. Calcular a degradação (D) para os recipientes F_I a partir do rendimento teórico de carbono inorgânico previsto apenas com base no componente de referência da mistura. Se, no dia 28, $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, pode presumir-se que o produto químico em estudo inibe a atividade do inóculo, facto que permite justificar os valores reduzidos de D_{FT} obtidos nas condições de ensaio. Neste caso, pode repetir-se o ensaio com uma concentração mais baixa, reduzindo, de preferência, o CID no inóculo e o CIT formado nos ensaios em branco, dado que, se assim não for, a redução da concentração reduzirá a precisão do método. Em alternativa, pode utilizar-se outro inóculo. Se, no frasco F_S (controlo da eliminação abiótica), se observar um aumento significativo (> 10 %) da quantidade de CIT, é possível que tenham ocorrido processos de degradação abiótica.

Validade dos resultados

66. Um ensaio é considerado válido se:

a) a percentagem média de degradação nos recipientes que contêm o produto químico de referência (F_C) for superior a 60 % até ao 14.º dia de incubação; e

b) a quantidade média de CIT presente nos ensaios em branco (F_B) no final do ensaio for superior a 3 mg C/l.

Se estes valores-limite não forem satisfeitos, repetir o ensaio com um inóculo proveniente de outra fonte e/ou rever os procedimentos utilizados. Por exemplo, caso se registe uma elevada produção de carbono inorgânico no ensaio em branco, deve seguir-se o procedimento indicado nos pontos 27 a 32.

(1) Percentagem de degradação nos recipientes F_C, que contêm a substância de referência.
(2) Percentagem de degradação nos recipientes F_I.

▼M4

67. Se o produto químico em estudo não gerar 60 % do teor de carbono inorgânico teórico e tiver sido demonstrado que não tem efeitos inibidores (ponto 65), pode repetir-se o ensaio com uma concentração mais elevada de inóculo (até 30 mg de lamas ativadas por litro e 100 ml de efluente por litro) ou com inóculos provenientes de outras fontes, nomeadamente nos casos em que a degradação se tenha situado na gama de 20 a 60 %.

Interpretação dos resultados

68. A obtenção de uma biodegradação superior a 60 % do carbono inorgânico teórico no período de 10 dias do presente ensaio demonstra que o produto químico em estudo é facilmente biodegradável em condições aeróbias.

69. Se o referido valor de 60 % não for atingido, determinar o pH no meio presente nos frascos que não tenham sido acidificados nem alcalinizados; um valor inferior a 6,5 pode indicar a ocorrência de nitrificação. Nesse caso, repetir o ensaio com uma solução-tampão de concentração mais elevada.

Relatório dos ensaios

70. Elaborar um quadro com a percentagem de degradação para cada frasco de ensaio (F_T), de referência (F_C) e, se for caso disso, de controlo da inibição (F_I), para cada dia de colheita de amostras. Se forem obtidos resultados comparáveis para os frascos replicados, traçar a curva da percentagem média de degradação (% D) em função do tempo. Registar o CIT nos frascos correspondentes aos ensaios em branco (F_B) e aos controlos estéreis (F_S), bem como o COD e/ou outros parâmetros, além da percentagem de remoção.

71. Determinar o valor médio da percentagem de degradação na fase de patamar, ou utilizar o valor mais elevado, se a curva de biodegradação começar a infletir na fase de patamar, e apresentar um deles como "grau de biodegradação do produto químico em estudo". Neste último caso, importa garantir que o valor mais elevado não é um resultado anómalo.

72. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produto químico em estudo:

— denominação comum, denominação química, número CAS, fórmula estrutural e propriedades físico-químicas pertinentes,

— grau de pureza do produto químico (presença de impurezas).

Condições experimentais:

— referência ao presente método,

— descrição do sistema de ensaio utilizado (por exemplo, volume dos recipientes, proporção espaço livre/volume de líquido, método de agitação, etc.),

— introdução do produto químico em estudo e do produto químico de referência no sistema de ensaio: concentração de ensaio utilizada, e quantidade de carbono introduzida, em cada frasco de ensaio, bem como os solventes eventualmente utilizados,

— pormenores relativos ao inóculo utilizado, bem como a qualquer pré-tratamento e pré-acondicionamento,

— temperatura de incubação,

— validação do princípio de análise do carbono inorgânico,

— principais características do analisador de carbono inorgânico (e de quaisquer outros métodos analíticos utilizados),

— número de replicados.

Resultados:

— dados não tratados e valores de biodegradabilidade calculados, na forma de quadros,

▼M4

— gráfico da percentagem de degradação em função do tempo, para o produto químico em estudo e o produto químico de referência, fase de latência, fase de degradação, período de 10 dias e declive,

— percentagem de remoção na fase de patamar, no final do ensaio e após o período de 10 dias,

— motivos de uma eventual rejeição de resultados dos ensaios,

— quaisquer outros factos relevantes ligados ao procedimento seguido,

— discussão dos resultados.

REFERÊNCIAS:

(1) Capítulo C.4 deste anexo: "Determinação da biodegradabilidade 'fácil' — Ensaio da libertação de CO_2" (método C.4-C).

(2) Sturm R.N. (1973): Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. *J. A. Oil Chem. Soc*. 50: 159-167.

(3) Larson R.J. (1979): Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. *Appl. Env. Microbiol*. 38: 1153-1161.

(4) Larson R.J., Hansmann M.A., Bookland E.A. (1996): Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants. *Chemosphere* 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; revista em 1999). Water Quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium — Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

(6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office Prevention Pesticides and Toxic Substances. Washington, DC.

(7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office Prevention Pesticides and Toxic Substances. Washington, DC.

(8) Gledhill W.E. (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. *Appl. Microbiol*. 30: 922-929.

(9) Weytjens D., Van Ginneken I., Painter H.A. (1994): The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. *Chemosphere* 28: 801-812.

(10) Ennis D.M., Kramer A. (1975): A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. *J. Food Sci*. 40: 181-185.

(11) Ennis D.M., Kramer A., Jameson C.W., Mazzoccki P.H., Bailey P. (1978). *Appl. Env. Microbiol*. 35: 51-53.

(12) Boatman R., Cunningham S.L., Ziegler D.A. (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals. *Env. Toxicol. Chem.* 5: 233-243.

(13) Struijs J., Stoltenkamp J. (1990): Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. *Ecotox. Env. Safety* 19: 204-211.

(14) Birch R.R., Fletcher R.J. (1991): The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. *Chemosphere* 23: 507-524.

(15) Birch R.R., Biver C., Campagna R., Gledhill W.E., Pagga U., Steber J., Reust H., Bontinck W.J. (1989): Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593 (1999) Water Quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels ($C0_2$ headspace test).

(17) Battersby N.S. (1997): The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test. *Chemosphere* 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance. Washington, DC.

(19) Battersby N.S., Ciccognani D., Evans M.R., King D., Painter H.A., Peterson D.R., Starkey M. (1999): An "inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. *Chemosphere* 38: 3219-3235.

(20) Capítulo C.4 deste anexo: "Determinação da biodegradabilidade 'fácil'".

(21) OCDE (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (Kitano, M., Takatsuki, M.; CITI). Paris.

(22) Capítulo C.11 deste anexo: "Biodegradação — Lamas Ativadas: Ensaios de Inibição da Respiração".

(23) Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M.J., Dekkers A.L.M. (1995): A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. *Biodegradation* 6: 319-327.

(24) UE (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697. Water Research Centre, Maio de 1999. Medmenham, SL7 2HD, Reino Unido.

(25) ISO 10634 (1996). Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

▼M4

Apêndice 1

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

CI: carbono inorgânico.

CO_2Te: o dióxido de carbono teórico (mg) é a quantidade calculada do dióxido de carbono que seria produzido a partir do teor de carbono medido ou conhecido do produto químico em estudo, quando totalmente mineralizado; também pode ser expresso em mg de dióxido de carbono libertado por mg de produto químico em estudo.

COD: o carbono orgânico dissolvido é o carbono orgânico presente na solução ou que passa através de um filtro de 0,45 micra ou que permanece no sobrenadante após centrifugação a cerca de 4 000 g (aproximadamente 40 000 ms^{-2}) durante 15 minutos.

CID: carbono inorgânico dissolvido.

CITe: carbono inorgânico teórico.

CIT: carbono inorgânico total.

Facilmente biodegradável: classificação arbitrária atribuída aos produtos químicos que satisfazem os critérios de determinados ensaios específicos de verificação da biodegradabilidade total; dado o grau de exigência destes ensaios, presume-se que esses produtos químicos são fácil e completamente biodegradados num ambiente aquático, em condições aeróbias.

Período de dez dias: período de dez dias imediatamente após ter sido alcançado o nível de biodegradação de 10 %.

Biodegradabilidade inerente: classificação atribuída aos produtos químicos para os quais existem provas inequívocas de biodegradação (primária ou total) num ensaio de biodegradabilidade.

Biodegradação aeróbia total: nível de degradação alcançado quando o produto químico em estudo é totalmente consumido pelos microrganismos, produzindo dióxido de carbono, água, sais minerais e novos componentes celulares microbianos (biomassa).

Mineralização: degradação completa de um produto químico orgânico em CO_2 e H_2O, em condições aeróbias, ou em CH_4, CO_2 e H_2O, em condições anaeróbias.

Fase de latência: período que decorre do início do ensaio até à aclimatação e/ou adaptação dos microrganismos responsáveis pela degradação e ao surgimento de um grau detetável de biodegradação do produto químico ou matéria orgânica em estudo (p. ex.: 10 % da biodegradação teórica máxima, ou menos, consoante a precisão da técnica de medição).

Fase de degradação: período que decorre do final da fase de latência até ao momento em que se atinge 90 % da degradação máxima.

Fase de patamar: fase na qual já se atingiu a degradação máxima e a curva de biodegração estabiliza.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

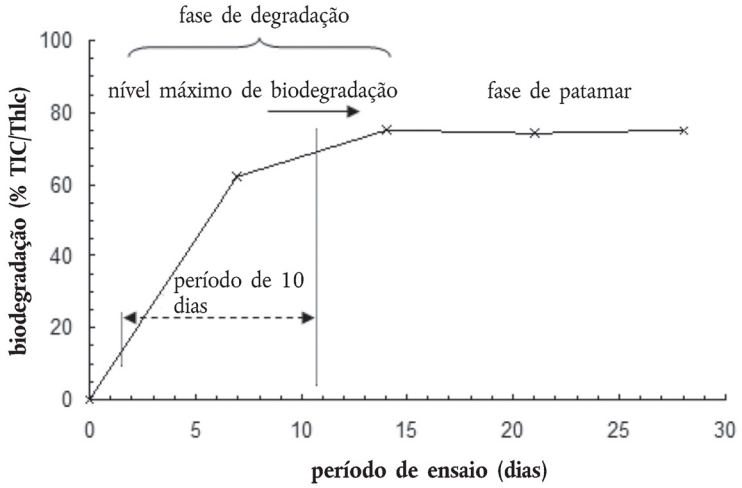
▼M4

Apêndice 2

Exemplo de curva de biodegradação

Figura 1

Biodegradação do 1-octanol no ensaio do CO_2 no espaço livre



Glossário

biodegradação

fase de degradação

nível máximo de biodegradação

fase de patamar

período de 10 dias

período de ensaio (dias)

▼M4

C.30. BIOACUMULAÇÃO EM OLIGOQUETAS TERRESTRES

INTRODUÇÃO

1. Este método de ensaio é equivalente ao da *Test Guideline 317* (TG 317) da OCDE (2010). Entre os métodos de ensaio relativos ao destino ambiental, foram publicados, respetivamente em 1996 e em 2008, "Bioconcentração: ensaio dinâmico no peixe" — capítulo C.13 deste anexo (49) e "Bioacumulação em oligoquetas bentónicos sedimentares" (53). A extrapolação dos dados de bioacumulação em meio aquático para organismos terrestres como as minhocas é difícil, senão impossível. São atualmente utilizados modelos de cálculo baseados na lipofilia do produto químico — p. ex., 14 e 37 — para avaliar a bioacumulação de produtos químicos no solo, tal como consta, por exemplo, do documento de orientação técnica da UE (19). A necessidade de um método de ensaio aplicável ao compartimento específico foi já abordada — p. ex., 55. Um tal método é particularmente importante para avaliar o envenenamento secundário nas cadeias alimentares terrestres (4). Há diversos métodos de ensaio nacionais que têm por objeto a bioacumulação noutros organismos que não os peixes — p. ex., 2 e 72. A *American Society for Testing and Materials* preparou um método de medição da bioacumulação causada por solos contaminados em minhocas (*Eisenia fetida*, Savigny) e oligoquetas da família *Enchytraeidae* (3). Um método internacionalmente aceite para a determinação da bioacumulação num solo enriquecido com determinado produto químico irá melhorar a avaliação dos riscos dos produtos químicos nos ecossistemas terrestres — p. ex., 25 e 29.

2. Os invertebrados geófagos estão expostos aos produtos químicos presentes no solo. Entre eles, os oligoquetas terrestres desempenham um papel importante na estrutura e na função dos solos (15)(20). Vivem no solo e, em parte, à superfície (sobretudo na manta morta) e representam frequentemente as espécies mais abundantes em termos de biomassa (54). Por causarem bioturbação do solo e por servirem de presa, estes animais podem ter grande influência na biodisponibilização de produtos químicos a outros organismos predadores, quer invertebrados — p. ex., ácaros e coleópteros, cf. 64 —, quer vertebrados — p. ex., raposas e gaivotas, cf. 18 e 62. No apêndice 5 são referidas algumas espécies de oligoquetas terrestres atualmente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos.

3. O guia da ASTM para ensaios laboratoriais de toxicidade do solo e de bioacumulação na minhoca *Eisenia fetida* e no oligoqueta *Enchytraeus albidus* (3) fornece muitas informações essenciais e úteis para a execução deste método de ensaio da bioacumulação no solo. Outros documentos referidos neste método de ensaio são o capítulo C.13 — "Bioconcentração: ensaio dinâmico no peixe" (49) — deste anexo e o *Test Guideline 315* da OCDE — *Bioaccumulation on Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes* (bioacumulação em oligoquetas bentónicos sedimentares), (53). Os resultados práticos referidos em estudos e publicações sobre bioacumulação no solo — p. ex., 1, 5, 11, 12, 28, 40, 43, 45, 57, 59, 76, 78 e 79 — são também uma importante fonte de informação para este método de ensaio.

4. O método é maioritariamente aplicável a produtos químicos orgânicos neutros e estáveis, que têm tendência para ser adsorvidos no solo. Permite estudar a bioacumulação de compostos organometálicos estáveis que se associam ao solo e é também aplicável a metais e outros oligoelementos.

CONDIÇÃO PRÉVIA

5. Para medir a bioacumulação de um produto químico em oligoquetas terrestres, foram realizados ensaios com metais pesados — p. ex., 63 — e com produtos químicos orgânicos persistentes que acusam valores de log K_{ow} entre 3,0 e 6,0 — p. ex., 40. Esses ensaios também se aplicam a:

— produtos químicos com log K_{ow} superior a 6,0 (superidrofóbicos),

▼M4

— produtos químicos pertencentes a classes de produtos químicos orgânicos com potencial reconhecido de bioacumulação em organismos vivos (por exemplo, produtos químicos tensioativos ou altamente adsorvíveis),

— produtos químicos com potencial de bioacumulação dedutível das suas características estruturais (por exemplo, análogos de produtos químicos com potencial de bioacumulação conhecido) e

— metais.

6. Antes de se iniciar o estudo, devem ser obtidos elementos identificativos do produto químico em causa, como: nome comum, denominação química (preferivelmente a denominação IUPAC), fórmula estrutural, número de registo CAS, grau de pureza, precauções de segurança, condições de conservação adequadas e métodos de análise. Devem também ser conhecidos os seguintes dados:

a) solubilidade em água;

b) coeficiente de partição octanol/água, K_{ow};

c) coeficiente de partição solo-água, expresso como K_{oc};

d) pressão de vapor;

e) degradabilidade (por exemplo, no solo e na água);

f) metabolitos conhecidos.

7. Podem ser utilizados no estudo produtos químicos com ou sem marcação radioativa. No entanto, para facilitar a análise, recomenda-se a utilização dos primeiros. A decisão deve ser tomada com base nos limites de deteção ou na obrigatoriedade de medir o produto químico parental e os seus metabolitos. Se for utilizado um produto químico com marcação radioativa e forem medidos os resíduos radioativos totais, importa que os resíduos com marcador radioativo presentes quer no solo quer nos organismos em estudo sejam caracterizados em termos de percentagem de produto químico parental e de percentagens de produtos químicos marcados não parentais — por exemplo, em amostras recolhidas em estado estacionário ou no final da fase de absorção — para permitir calcular o fator de bioacumulação (BAF) do produto químico parental e dos metabolitos pertinentes deste no solo (cf. ponto 50). O método aqui descrito poderá ter de ser modificado — por exemplo, a fim de se dispor de biomassa suficiente — para medir produtos químicos orgânicos sem marcação radioativa ou metais. Na medição dos resíduos radioativos totais (por contagem de cintilação em meio líquido após extração, combustão ou solubilização dos tecidos), o fator de bioacumulação baseia-se no produto químico parental e nos metabolitos deste. O cálculo do BAF deve preferencialmente ter por base a concentração do produto químico parental nos organismos e os resíduos radioativos totais. Seguidamente, por razões de comparabilidade entre os resultados dos diversos ensaios de bioacumulação, calcula-se a partir do BAF o fator de acumulação biota-solo (BSAF), normalizado em relação ao teor de lípidos dos vermes e ao teor de carbono orgânico do solo.

8. A toxicidade do produto químico em estudo para as espécies utilizadas no ensaio deve ser conhecida: por exemplo, a concentração com efeitos (CE_x) ou a concentração letal (CL_x) relativas ao tempo de duração da fase de absorção — p. ex., 19. A concentração do produto químico em estudo deve ser, preferencialmente, cerca de 1 % da CL_{50} aguda assintótica do mesmo e pelo menos dez vezes superior ao limite de deteção do prosuto químico no solo pelo método de análise utilizado. Se possível, deve ser dada preferência a valores de toxicidade derivados de estudos de longa duração a efeitos subletais (51)(52). Se não estiverem disponíveis tais dados, um teste de toxicidade aguda dará informações úteis — p. ex., 23.

▼M4

9. Deve dispor-se de um método de análise adequado, com exatidão, precisão e sensibilidade conhecidas, para determinar quantitativamente o produto químico nas soluções de ensaio, no solo e na matéria biológica, juntamente com os pormenores da preparação e da armazenagem das amostras e as correspondentes fichas de dados de segurançal. Devem também ser conhecidos os limites analíticos de deteção do produto químico no solo e nos tecidos dos vermes. Se for utilizado no ensaio um produto químico marcado com ^{14}C, devem ser conhecidas a radioatividade específica (em $Bq.mol^{-1}$) e a percentagem de radioatividade associada a impurezas. A radioatividade específica do produto químico em estudo deve ser suficientemente elevada para facilitar as análises, e as concentrações de ensaio não devem induzir efeitos tóxicos.

10. O ensaio pode ser executado com solo artificial ou natural. Antes de se iniciar o ensaio, importa conhecer as características do solo natural utilizado, como, por exemplo, a origem ou os componentes do solo, o pH, o teor de carbono orgânico, a distribuição granulométrica (percentagem de areia, de limo e de argila) e a capacidade de retenção de água — (3)(48).

PRINCÍPIO DO ENSAIO

11. Os parâmetros que caracterizam a bioacumulação de um produto químico incluem o fator de bioacumulação (BAF), a constante de velocidade de absorção (k_s) e a constante de velocidade de eliminação (k_e). Estes parâmetros são definidos no apêndice 1.

12. O ensaio compreende duas fases: a fase de absorção (exposição) e a fase de eliminação (pós-exposição). Durante a fase de absorção, são expostos ao solo, previamente enriquecido com o produto químico em estudo, grupos replicados de vermes. Paralelamente aos vermes cobaias, mantêm-se em condições idênticas, mas sem o produto químico em estudo, grupos de vermes de controlo. Mede-se a massa seca e o teor de lípidos dos organismos sujeitos ao ensaio. Para o efeito, podem utilizar-se vermes do grupo de controlo. Os valores de fundo analíticos (ensaios em branco) podem ser obtidos analisando amostras dos vermes de controlo e do solo. Para a fase de eliminação, os vermes são transferidos para um solo isento do produto químico em estudo. É sempre necessária uma fase de eliminação, a menos que a absorção do produto químico durante a fase de exposição tenha sido insignificante. A fase de eliminação fornece informações sobre a velocidade à qual o produto químico é excretado pelos organismos sujeitos ao ensaio — p. ex., 27. Se, durante a fase de absorção, não tiver sido atingido um estado estacionário, a determinação dos parâmetros cinéticos — fator de bioacumulação cinético BAFk, constante de velocidade de absorção e constante de velocidade de eliminação — deve basear-se preferencialmente num ajustamento simultâneo aos resultados das fases de absorção e de eliminação. A concentração do produto químico no interior ou à superfície dos vermes é monitorizada ao longo de ambas as fases do ensaio.

13. Durante a fase de absorção, são feitas medições a intervalos de amostragem que podem chegar a 14 dias (família *Enchytraeidae*) ou a 21 dias (minhocas) até ser atingido o estado estacionário (11)(12)(67). O estado estacionário ocorre quando o gráfico da concentração nos vermes em função do tempo é paralelo ao eixo do tempo, e três análises sucessivas da concentração feitas em amostras colhidas a intervalos de pelo menos dois dias variam entre si, no máximo, 20 %, com base em comparações estatísticas (p. ex., análise da variância, análise de regressão).

14. A fase de eliminação consiste em transferir os organismos sujeitos ao ensaio para recipientes que contêm o mesmo substrato, mas sem o produto químico em estudo. Durante a fase de eliminação, são feitas medições a intervalos de amostragem que podem chegar a 14 dias (família *Enchytraeidae*) ou a 21 dias (minhocas), a menos que determinações analíticas anteriores tenham mostrado uma redução de 90 % dos resíduos do produto químico nos vermes. A concentração do produto químico nos vermes no final da fase de eliminação é indicada como correspondente a resíduos não eliminados. O

▼M4

fator de bioacumulação em estado estacionário (BAF_{ss}) é calculado preferencialmente como quociente entre a concentração nos vermes (C_a) e a concentração no solo (C_s) em estado estacionário aparente e também como fator de bioacumulação cinético, BAF_K, dado pelo quociente entre a constante de velocidade de absorção do solo (k_s) e a constante de velocidade de eliminação (k_e) (ver definições no apêndice 1), assumindo uma cinética de primeira ordem (ver cálculos no apêndice 2). Se a cinética de primeira ordem for manifestamente inaplicável, devem ser empregues outros modelos.

15. A constante de velocidade de absorção, a constante de velocidade de eliminação (ou as constantes, se forem utilizados outros modelos), o fator de bioacumulação cinético (BAF_K) e, se possível, os limites de confiança de cada um destes parâmetros são calculados por meios informáticos a partir de equações de modelo (ver orientações no apêndice 2). A adequação de um modelo pode ser determinada a partir, por exemplo, do coeficiente de correlação ou do coeficiente de determinação (coeficientes próximos de 1 indicam boa adequação) ou da lei do qui-quadrado. A amplitude do erro-padrão ou do limite de confiança dos parâmetros estimados pode também dar uma boa indicação da adequação do modelo.

16. Para reduzir a variabilidade dos resultados dos ensaios de produtos químicos muito lipofílicos, os fatores de bioacumulação devem ser expressos em relação ao teor de lípidos e ao teor de carbono orgânico (kg de carbono orgânico no solo. kg^{-1} de lípidos nos vermes). Esta abordagem baseia-se no facto de que, para algumas classes de produtos químicos, há uma relação clara entre o potencial de bioacumulação e a lipofilia, relação essa bem estabelecida no caso dos peixes (47). Há uma relação entre o teor de lípidos dos peixes e a bioacumulação dos produtos químicos em causa. Em organismos bentónicos, foram descobertas correlações similares — p. ex., 30 e 44. Esta correlação foi igualmente demonstrada em oligoquetas terrestres — p. ex., 5, 6, 7 e 14. Se se dispuser de tecido suficiente, o teor de lípidos dos vermes sujeitos ao ensaio pode ser determinado na mesma matéria biológica utilizada para determinar a concentração do produto químico em estudo. Alternativamente, podem utilizar-se animais de controlo para medir o teor de lípidos.

VALIDADE DOS ENSAIOS

17. Para que um ensaio seja válido, devem ser cumpridos os seguintes critérios, quer por parte dos organismos de controlo quer por parte dos organismos expostos:

— no final do ensaio, a mortalidade total durante as fases de absorção e de eliminação não pode exceder 10 % (minhocas) ou 20 % (família *Enchytraeidae*) do número total de vermes introduzidos;

— para *Eisenia fetida* e *E. andrei*, a perda média de massa, medida no final da fase de absorção e no final da fase de eliminação, não pode exceder 20 % da massa fresca inicial da respetiva fase.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Espécies sujeitas a ensaio

18. Para estudar a bioacumulação, recomenda-se várias espécies de oligoquetas terrestres. As mais utilizadas — *Eisenia fetida* ou *E. andrei* (família *Lumbricidae*) e *Enchytraeus albidus*, *E. crypticus* ou *E. luxuriosus* (família *Enchytraeidae*) — são descritas no apêndice 5.

▼M4

Dispositivos

19. Deve ser evitada a utilização, em qualquer parte do equipamento, de materiais capazes de dissolver ou adsorver o produto químico em estudo ou de permitir fugas de outros produtos químicos ou que tenham um efeito adverso nos animais sujeitos ao ensaio. Servem recipientes normalizados retangulares ou cilíndricos, de materiais quimicamente inertes e com capacidade adequada à carga, isto é, ao número de vermes sujeitos ao ensaio. Pode ser utilizado aço inoxidável, plástico ou vidro em qualquer equipamento que entre em contacto com os meios de ensaio. Os recipientes de ensaio devem ser adequadamente cobertos para impedir a fuga dos vermes, mas permitindo uma entrada de ar suficiente. No caso de produtos químicos com coeficiente de adsorção elevado, como os piretroides sintéticos, pode ser necessário vidro silanizado. Em tais situações, importa descartar o equipamento após a utilização (49). Devem ser impedidas fugas de produtos químicos com marcação radioativa e de produtos químicos voláteis. Devem ser utilizadas armadilhas (por exemplo, garrafas de vidro para lavagem de gases) contendo absorventes capazes de reter os resíduos que se evaporem dos recipientes de ensaio.

Solo

20. A qualidade do solo ensaiado deve permitir a sobrevivência e, preferivelmente, a reprodução dos organismos durante os períodos de aclimatação e de ensaio, sem apresentarem aspeto ou comportamento anormal. É necessário que os vermes se enterrem no solo.

21. Como substrato para o ensaio é recomendado o solo artificial descrito no capítulo C.8 deste anexo — (48). No apêndice 4 é descrita a preparação do solo artificial a utilizar nos ensaios de bioacumulação e são feitas recomendações sobre a armazenagem de solos artificiais. O solo artificial seco ao ar pode ser armazenado à temperatura ambiente até à sua utilização.

22. Contudo, também solos naturais de locais não poluídos podem servir para ensaio e/ou para cultura. Devem conhecer-se, no mínimo, as suas características seguintes: origem (local de recolha), pH, teor de carbono orgânico, distribuição granulométrica (percentagem de areia, de limo e de argila), capacidade máxima de retenção de água (WHC_{max}) e teor percentual de água (3). A pesquisa de micropoluentes no solo ou nos seus componentes antes da utilização deverá proporcionar informações úteis. Caso se utilize solo natural proveniente de terras agrícolas, as amostras não devem ser colhidas menos de um ano após o último tratamento com produtos fitofarmacêuticos ou da última aplicação de estrume de animais, nem menos de seis meses após o último tratamento com fertilizantes orgânicos (50). Na referência 3 são descritos procedimentos de manipulação de solos naturais antes da sua utilização em ensaios laboratoriais de ecotoxicologia com oligoquetas. O tempo de armazenagem de solos naturais em laboratório deve ser o mais curto possível.

Aplicação do produto químico em estudo

23. O produto químico é incorporado no solo. As suas propriedades físico-químicas devem ser tidas em conta. Os produtos químicos hidrossolúveis devem ser completamente dissolvidos em água antes da sua mistura com o solo. O procedimento de enriquecimento recomendado para produtos químicos pouco hidrossolúveis consiste em incorporar o produto químico em estudo num ou mais dos componentes do solo (artificial). Por exemplo, a areia quartzítica (ou uma parte dela) pode ser embebida numa solução do produto químico com um solvente orgânico adequado que, em seguida, é lentamente evaporado até a areia secar. A fração impregnada pode então ser misturada com o solo humedecido. A grande vantagem deste procedimento é que não se introduz nenhum solvente no solo. Se for utilizado solo natural, o produto químico em estudo pode ser adicionado enriquecendo, pelo método atrás descrito para solo artificial, uma porção do solo seca ao

▼M4

ar, ou misturando o produto químico no solo húmido, com subsequente evaporação se se tiver utilizado um agente solubilizante. Em geral, deve evitar-se o mais possível o contacto de solo húmido com solventes. Ter em conta o seguinte (3):

— se se utilizar um solvente que não água, importa que seja hidromiscível e/ou possa ser removido (por evaporação, por exemplo,), deixando no solo apenas o produto químico em estudo,

— se se recorrer a um controlo do solvente, não é necessário controlo negativo. O controlo do solvente deve conter a mais elevada concentração de solvente adicionado ao solo e utilizar solvente do mesmo lote que serviu para preparar a solução-mãe. A toxicidade e a volatilidade do solvente e a solubilidade do produto químico em estudo no solvente escolhido devem ser os critérios principais para a seleção de um agente solubilizante adequado.

24. No caso dos produtos químicos pouco solúveis em água ou em solventes orgânicos, podem misturar-se (com almofariz e pilão, por exemplo,) 2,0--2,5 g de areia quartzítica finamente moída por cada recipiente de ensaio com a quantidade do produto químico em estudo, até obter a concentração de ensaio desejada. Esta mistura de areia quartzítica e produto químico é misturada cuidadosamente com o solo previamente humedecido, adicionando água desionizada até obter o teor de humidade necessário. A mistura final é distribuída pelos recipientes de ensaio. Repete-se o procedimento para cada concentração de ensaio e prepara-se também um controlo adequado, com 2,0-2,5 g de areia quartzítica finamente moída em cada recipiente.

25. Após o enriquecimento, determina-se a concentração do produto químico no solo. A distribuição homogénea do produto no solo deve ser verificada antes de se introduzirem os organismos que vão ser sujeitos ao ensaio. Deve indicar-se o método utilizado para o enriquecimento, bem como as razões da escolha de um determinado procedimento de enriquecimento (24).

26. Antes de se adicionar os organismos, deve, idealmente, estabelecer-se um equilíbrio entre o solo e a água intersticial, para o que se recomenda um período de quatro dias a 20 °C. Para muitos produtos químicos orgânicos pouco hidrossolúveis, o tempo necessário para alcançar um verdadeiro equilíbrio entre as frações adsorvida e dissolvida pode ser de dias ou meses. Dependendo da finalidade do estudo — por exemplo, quando se trata de imitar as condições ambientais —, o solo enriquecido poderá ter de ser "envelhecido" por um período mais longo — por exemplo, no caso dos metais, três semanas a 20 °C (22).

Cultura dos organismos a ensaiar

27. De preferência, deve ter-se uma cultura permanente dos vermes no laboratório. O apêndice 5 dá orientações sobre métodos de cultura laboratorial de *Eisenia fetida* e de *E. andrei*, bem como de espécies da família *Enchytraeidae* — ver também 48, 51 e 52.

28. Os vermes utilizados nos ensaios devem estar isentos de doenças, anomalias e parasitas visíveis.

REALIZAÇÃO DO ENSAIO

29. Os organismos sujeitos a ensaio são expostos ao produto químico em estudo durante a fase de absorção, que deve durar 14 dias (família *Enchytraeidae*) ou 21 dias (minhocas), a menos que se demonstre que o estado estacionário foi alcançado.

▼M4

30. Para a fase de eliminação, os vermes são transferidos para um solo isento do produto químico em estudo. A primeira amostra deve ser colhida entre 4 e 24 horas após o início da fase de eliminação. O apêndice 3 contém exemplos de programação da colheita de amostras para uma fase de absorção de 21 dias e uma fase de eliminação de 21 dias.

Organismos sujeitos aos ensaios

31. Em muitas espécies terrestres da família *Enchytraeidae*, a massa individual é bastante baixa (por exemplo, 5-10 mg de massa húmida por indivíduo no caso de *Enchytraeus albidus* e menos no caso de *E. crypticus* ou *E. luxuriosus*). Para efetuar as pesagens e as análises químicas, pode ser necessário juntar os vermes de cada recipiente de replicação (ou seja, todos os vermes de um recipiente de replicação para se obter um resultado único de análise de tecido). A cada replicado são adicionados vinte espécimes de *Enchytraeidae*, devendo ser utilizados pelo menos três replicados. Se o limite de deteção analítico do produto químico em estudo for elevado, poderão ser necessários mais vermes. Para as espécies com maior massa individual (*Eisenia fetida* e *E. andrei*), podem ser utilizados recipientes de replicação com um só espécime.

32. As minhocas utilizadas num ensaio devem ter massa similar (por exemplo, cada espécime de *Eisenia fetida* e *E. andrei* deve ter massa de 250-600 mg). Os espécimes da família *Enchytraeidae* (por exemplo, da espécie *Enchytraeus albidus*) devem ter um comprimento de aproximadamente 1 cm. Todos os vermes utilizados num ensaio devem provir da mesma fonte e ser adultos com clitélio (ver apêndice 5). Uma vez que a massa e a idade do animal podem ter influência nos valores do BAF (por exemplo, devido a variações no teor de lípidos e/ou à presença de ovos), tais parâmetros devem ser registados com exatidão e tidos em conta na interpretação dos resultados. Por outro lado, durante o período de exposição, podem surgir casulos de ovos, o que terá também efeito nos valores do BAF. Recomenda-se a pesagem de uma subamostra dos vermes antes do ensaio, a fim de estimar os valores médios da massa húmida e da massa seca.

33. Deve utilizar-se um rácio elevado solo/vermes, a fim de minimizar o decréscimo da concentração do produto químico no solo durante a fase de absorção. Para as espécies *Eisenia fetida* e *E. andrei*, recomenda-se um valor mínimo de 50 g de massa seca de solo por cada verme e, para a família *Enchytraeidae*, um mínimo de 10-20 g de massa seca de solo por cada recipiente de ensaio. Os recipientes devem conter uma camada de solo de 2-3 cm no caso de vermes da família *Enchytraeidae* ou de 4-5 cm no caso das minhocas.

34. Os vermes a ensaiar são retirados da cultura (no caso da família *Enchytraeidae*, por exemplo, com recurso a pinças de joalheiro). Transfere-se animais adultos para solo não tratado, para aclimatação, e alimentam-se (cf. ponto 36). Se as condições de ensaio diferirem das condições de cultura, deverá ser suficiente uma fase de aclimatação de 24-72 horas para adaptar os vermes às condições de ensaio. Terminada a aclimatação, os vermes são transferidos para vasos de vidro (por exemplo, placas de Petri) com água limpa, para ser lavados, e em seguida são pesados, antes da sua colocação no solo de ensaio. Antes da pesagem, a água em excesso deve ser removida dos vermes, percutindo-os delicadamente contra as bordas da placa ou secando-os com cuidado por meio de um toalhete de papel ligeiramente humedecido.

35. Deve observar-se e registar-se o comportamento dos organismos sujeitos a ensaio, em termos de enterramento no solo. Nos ensaios com minhocas, os animais (de controlo ou expostos) enterram-se normalmente ao cabo de algumas horas; este comportamento deve ser confirmado, o mais tardar, 24 h após a colocação dos vermes nos recipientes de ensaio. Se as minhocas não se enterrarem (por exemplo, mais de 10 % delas ao cabo de mais de metade da fase de absorção), é sinal de que as condições do ensaio não são adequadas ou de que as minhocas não estão saudáveis. Nesse caso, o ensaio deve ser interrompido e repetido. Os vermes da família *Enchytraeidae* vivem sobretudo nos poros intersticiais do solo e é frequente o seu tegumento

▼M4

estar só parcialmente em contacto com o substrato circundante; considera-se que, nesta família, a exposição dos vermes que se enterram é equivalente à dos que não se enterram, pelo que a ausência de enterramento não exige necessariamente a repetição do ensaio.

Alimentação

36. É necessário alimentar os vermes quando se utiliza um solo com baixo teor de carbono orgânico total. Caso se utilize um solo artificial, recomenda-se uma frequência de alimentação semanal (ou seja, os vermes são alimentados uma vez por semana), com 7 mg de esterco seco por 1 g de solo seco no caso das minhocas e com 2-2,5 mg de flocos de aveia moídos por 1 g de solo seco no caso da família *Enchytraeidae* (11). A primeira ração alimentar deve ser misturada com o solo imediatamente antes da colocação dos organismos a ensaiar. É preferível utilizar o mesmo tipo de alimento que nas culturas (ver apêndice 5).

Luz e temperatura

37. Os ensaios devem ser realizados segundo um ciclo controlado de 16 horas de luz e 8 de obscuridade, preferencialmente com uma intensidade de 400-800 lx na zona dos recipientes de ensaio (3). A temperatura deve ser de 20 ± 2 °C ao longo de todo o ensaio.

Concentrações de ensaio

38. É utilizada uma única concentração. As situações em que se exijam concentrações adicionais devem ser justificadas. Se a toxicidade (CE_x) do produto químico em estudo for próxima do limite de deteção analítico, recomenda-se a utilização de um produto químico marcado radioativamente com elevada radioatividade específica. Para metais, a concentração deve ser superior ao nível de fundo nos tecidos e no solo.

Replicados

39. Para as medições cinéticas (fase de absorção e fase de eliminação), o número mínimo de recipientes de replicação expostos é de três por cada ponto de amostragem. O número total de replicados preparados deve ser suficiente para abranger todos os tempos de amostragem durante a fase de absorção e a fase de eliminação.

40. Para as observações e medições biológicas (quociente entre massa seca e massa húmida, teor de lípidos, etc.) e para a análise das concentrações de fundo nos vermes e no solo, devem ser constituídos pelo menos doze recipientes de replicação de um controlo negativo (colheita de amostras em quatro recipientes no início da fase de absorção, em quatro no final da fase de absorção e em quatro no final da fase de eliminação), se não tiver sido utilizado outro solvente além da água. Se for utilizado um qualquer agente solubilizante para a aplicação do produto químico em estudo, deve-se ensaiar, além dos replicados expostos, um controlo do solvente (colheita de amostras em quatro recipientes de replicação no início da fase de absorção, em quatro no final da fase de absorção e em quatro no final da fase de eliminação), contendo todos os componentes, com exceção do produto químico em estudo. Neste caso, podem também ser constituídos quatro recipientes de replicação adicionais de um controlo negativo (sem solvente), para amostragem opcional no final da fase de absorção. Estes replicados podem ser comparados biologicamente com o controlo do solvente a fim de obter informações sobre uma eventual influência do solvente nos organismos sujeitos ao ensaio. Recomenda-se a constituição de um número suficiente de recipientes de replicação adicionais de reserva (por exemplo, oito) para exposição e controlo(s).

▼M4

Frequência das medições da qualidade do solo

41. No início e no final da fase de absorção e da fase de eliminação medem-se o pH e o teor de humidade do solo. A temperatura no local do ensaio é medida continuamente. O teor de humidade do solo deve ser verificado uma vez por semana, pesando os recipientes de ensaio e comparando as massas obtidas com as massas iniciais (isto é, no início do ensaio). As perdas de água devem ser repostas com água desionizada.

Colheita de amostras e análise dos vermes e do solo

42. O apêndice 3 contém exemplos de programação da colheita de amostras para a fase de absorção e para a fase de eliminação em ensaios de bioacumulação realizados com minhocas e com vermes da família *Enchytraeidae*.

43. Antes da colocação dos vermes, durante a fase de absorção e durante a fase de eliminação, colhe-se amostras de solo dos recipientes de ensaio para determinar a concentração do produto químico em estudo. Durante o ensaio, determina-se as concentrações do produto químico nos vermes e no solo. Em geral, mede-se as concentrações totais no solo. Facultativamente, pode medir-se as concentrações na água intersticial, caso em que, antes do início do estudo, deve conhecer-se os fundamentos disso e deve dispor-se dos métodos adequados (elementos a incluir posteriormente no relatório).

44. Colhe-se amostras dos vermes e do solo em, pelo menos, seis ocasiões durante a fase de absorção e a fase de eliminação. Se a estabilidade do produto químico em estudo for demonstrada, pode reduzir-se o número de análises ao solo. Recomenda-se a análise de, pelo menos, três replicados no início e no final da fase de absorção. Se a concentração no solo medida no final da fase de absorção diferir em mais de 30 % da medida no início, devem também ser analisadas as amostras de solo colhidas noutras datas.

45. A cada tempo de colheita de amostras, os vermes do replicado em causa são retirados do solo (por exemplo, espalhando o solo do replicado sobre um tabuleiro raso e colhendo os vermes com pinças de joalheiro) e lavados rapidamente em água num tabuleiro raso de vidro ou aço. Remove-se a água em excesso (cf. ponto 34). Transfere-se os vermes cuidadosamente para um recipiente previamente tarado e pesando-se de imediato, incluindo o conteúdo do trato digestivo.

46. No caso das minhocas (*Eisenia* sp.), deixam-se evacuar o trato digestivo de um dia para o outro — por exemplo, sobre papel de filtro humedecido, numa placa de Petri coberta (cf. ponto 34). Após essa purga, determina-se a massa dos vermes, a fim de avaliar um eventual decréscimo da biomassa durante o ensaio (ver critérios de validade no ponto 17). No caso dos vermes da família *Enchytraeidae*, a pesagem e a análise de tecidos são efetuadas sem purga do trato digestivo, por esta ser tecnicamente difícil devido às pequenas dimensões destes animais. Terminada a pesagem final, os vermes devem ser occisados de imediato, pelo método mais adequado (por exemplo, com azoto líquido ou por congelamento a temperaturas inferiores a -18 °C).

47. Durante a fase de eliminação, os vermes substituem o conteúdo contaminado do trato digestivo por solo limpo. Quer isto dizer que, no caso de animais que não purgaram o trato digestivo (vermes da família *Enchytraeidae*, neste caso) integrantes de amostras colhidas imediatamente antes da fase de eliminação, as medições incluem solo contaminado presente no trato digestivo. Em relação aos oligoquetas aquáticos, considera-se que, após as primeiras 4 a 24 horas da fase de eliminação, a maior parte do conteúdo contaminado do trato digestivo foi substituída por sedimento limpo — p. ex., 46. Observou-se o mesmo em minhocas em estudos sobre a acumulação de cádmio e zinco com marcação radioativa (78). Nos vermes da família *Enchytraeidae*, que não purgaram o trato digestivo, a concentração desta primeira amostra da fase de eliminação pode ser considerada como concentração nos tecidos após purga do trato digestivo. Para atender à diluição da concentração do produto químico em estudo por solo não contaminado, durante a fase de eliminação, a massa do conteúdo do trato digestivo pode ser estimada a partir do quociente entre a massa húmida de vermes e a massa das suas cinzas ou do quociente entre a massa seca de vermes e a massa das suas cinzas.

▼M4

48. As amostras de solo e de vermes devem, de preferência, ser analisadas imediatamente após a remoção (ou seja, no prazo de um a dois dias), a fim de evitar degradações ou outras perdas, e é recomendável calcular as velocidade aproximadas de absorção e de eliminação no decurso do ensaio. Se a análise for adiada, as amostras devem ser armazenadas por um método adequado — por exemplo, ultracongelamento (≤ -18 °C).

49. Deve confirmar-se se a precisão e a reprodutibilidade da análise química, bem como a recuperação do produto químico em estudo das amostras de solo e das amostras de vermes, são satisfatórias para o método em questão. Devem indicar-se a eficácia da extração, o limite de deteção e o limite de quantificação. Do mesmo modo, deve confirmar-se que o produto químico em estudo não é detetável nos recipientes de controlo em concentrações superiores ao nível de fundo. A concentração do produto químico em estudo (C_a), se for > 0 nos vermes de controlo, deve ser incluída no cálculo dos parâmetros cinéticos (cf. apêndice 2). Ao longo de todo o ensaio, as amostras devem ser manipuladas de modo a minimizar contaminações e perdas (resultantes, por exemplo, da adsorção do produto químico em estudo no dispositivo de colheita das amostras).

50. Caso se estude um produto químico com marcação radioativa, é possível analisar o produto químico parental e os seus metabolitos. A determinação quantitativa do produto químico parental e dos seus metabolitos em estado estacionário ou no final da fase de absorção fornece informações importantes. As amostras devem então ser limpas, para que possa determinar-se quantitativamente apenas o produto químico parental. Se a um único metabolito corresponderem mais de 10 % da radioatividade total na(s) amostra(s) analisada(s), é recomendável identificá-lo.

51. Devem ser registadas e indicadas a recuperação global e a recuperação do produto químico nos vermes, no solo e em eventuais armadilhas com absorventes para reter o produto químico evaporado.

52. O agrupamento dos espécimes que constituem a amostra colhida num determinado recipiente de ensaio é aceitável em relação aos vermes da família *Enchytraeidae*, que são menores do que as minhocas. Se o agrupamento implicar a redução do número de replicados, os procedimentos estatísticos aplicáveis aos dados sofrerão limitações. Se forem exigíveis um procedimento estatístico e uma representatividade estatística específicos, deve ser utilizado no ensaio um número de recipientes de replicação adequado ao agrupamento, ao procedimento e à representatividade pretendidos.

53. Recomenda-se que o BAF seja expresso em função da massa seca total e, quando necessário (ou seja, no caso de produtos químicos muito hidrofóbicos), também em função do teor de lípidos. Devem ser utilizados métodos adequados para determinar o teor de lípidos (alguns dos métodos existentes — p. ex., 31 e 58 — têm de ser adaptados para o efeito). Estes métodos recorrem a uma técnica de extração com clorofórmio/metanol. No entanto, para evitar os solventes clorados, deve utilizar-se uma versão modificada do método de Bligh e Dyer (9), descrita na referência (17). Como os vários métodos podem não conduzir a resultados idênticos, importa explicar o método utilizado. Sempre que possível, isto é, quando se dispuser de tecido suficiente, a análise dos lípidos deve, idealmente, ser feita na mesma amostra ou no mesmo extrato que a análise do produto químico em estudo, porquanto os lípidos têm frequentemente de ser removidos do extrato antes de este poder ser analisado cromatograficamente (49). Alternativamente, pode utilizar-se animais de controlo para medir o teor de lípidos, que serve em seguida para normalizar os valores do BAF. Esta última metodologia reduz a contaminação do equipamento com o produto químico em estudo.

▼M4

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

54. A curva de absorção do produto químico em estudo é obtida exprimindo em função do tempo a concentração do produto no interior ou à superfície dos vermes durante a fase de absorção, em escalas aritméticas. Quando a curva atinge um patamar ou estado estacionário (ver definições no apêndice 1), calcula-se o fator de bioacumulação em estado estacionário BAF_{ss} pela seguinte fração:

$$\frac{C_a \text{ em estado estacionário ou no final da fase de absorção (média)}}{C_s \text{ em estado estacionário ou no final da fase de absorção (média)}}$$

C_a Ca é a concentração do produto químico em estudo no organismo sujeito ao ensaio;

C_s é a concentração do produto químico em estudo no solo.

55. Se não for atingido estado estacionário (ou seja, se a curva não atingir um patamar), deve ser determinado o BAF_K, baseado nas constantes de velocidade, em vez do BAF_{ss}, como se segue:

— determina-se o fator de acumulação (BAF_K) como quociente $k_s/k_{e,}$

— de preferência, as velocidades de absorção e de eliminação calculam-se simultaneamente (cf. equação 11 no apêndice 2),

— a constante de velocidade de eliminação (k_e) é normalmente determinada a partir da curva de eliminação (ou seja, da linha que representa a concentração do produto químico nos vermes durante a fase de eliminação). A constante de velocidade de absorção (k_s) é então calculada em função de k_e e de um valor de C_a derivado da curva de absorção — ver no apêndice 2 uma descrição destes métodos. Para obter o fator BAF_K e as constantes de velocidade k_s e k_e, é preferível recorrer a métodos informáticos de estimativa de parâmetros não lineares. Se, manifestamente, a curva de eliminação não obedecer a uma cinética de primeira ordem, devem ser utilizados modelos mais complexos.

Relatório dos ensaios

56. Elementos a constar do relatório dos ensaios:

Produto químico em estudo:

— todas as informações disponíveis sobre toxicidade aguda e a longo prazo (p. ex., CE_x, CL_x, NOEC) para oligoquetas que vivem no solo,

— grau de pureza, estado físico e propriedades físico-químicas — p. ex., log K_{ow}, hidrossolubilidade,

— dados de identificação química: proveniência do produto químico em estudo, identidade e concentração dos solventes eventualmente utilizados,

— se o produto químico tiver marcação radioativa, a posição precisa dos átomos marcados, a radioatividade específica e a pureza radioquímica.

Espécies sujeitas ao ensaio:

— denominação científica, estirpe, origem, pré-tratamentos eventuais, aclimatação, idade, gama de dimensões, etc.

▼M4

Condições de realização dos ensaios:

— procedimento de ensaio utilizado,

— tipo e características da iluminação utilizada e fotoperíodo(s),

— protocolo do ensaio (por exemplo, número e tamanho dos recipientes, massa de solo e espessura da camada de solo, número de replicados, número de vermes por replicado, número de concentrações de ensaio, duração da fase de absorção e da fase de eliminação, frequência da colheita de amostras),

— justificação da escolha do material dos recipientes de ensaio,

— método de preparação e aplicação do produto químico em estudo e razões da escolha desse método,

— concentrações de ensaio nominais, bem como as médias e os desvios-padrão dos valores medidos nos recipientes de ensaio e o método de obtenção desses valores,

— origem dos componentes do solo artificial ou — se se utilizar um meio natural — origem do solo, descrição de eventuais pré-tratamentos, resultados dos controlos (sobrevivência, evolução da biomassa, reprodução), características do solo — pH, teor de carbono orgânico total, distribuição granulométrica (percentagem de areia, de limo e de argila), capacidade máxima de retenção de água, teor percentual de água no início e no final do ensaio e quaisquer outras medições efetuadas,

— explicação do tratamento das amostras de solo e de vermes, incluindo elementos sobre a preparação, a armazenagem, os procedimentos de enriquecimento do solo com o produto químico em estudo, a extração, os procedimentos de análise (e sua precisão) do produto químico nos vermes e no solo, o teor de lípidos (se for medido) e as recuperações do produto químico em estudo.

Resultados:

— mortalidade dos vermes de controlo e dos vermes de cada recipiente de ensaio e eventuais comportamentos anormais observados (por exemplo, os vermes evitam o solo, não se verifica a reprodução de vermes da família *Enchytraeidae* num ensaio de bioacumulação, etc.),

— quociente entre massa seca e massa húmida, quer do solo quer dos organismos sujeitos ao ensaio (útil para a normalização),

— massa húmida dos vermes em cada tempo de colheita de amostras; no caso das minhocas, a massa húmida no início do ensaio e em cada tempo de colheita de amostras antes e depois da purga do trato digestivo,

— teor de lípidos dos organismos sujeitos ao ensaio (se for medido),

— curvas indicando a cinética de absorção e de eliminação do produto químico nos vermes e o intervalo de tempo até ao estado estacionário,

— C_a e C_s (com desvio-padrão e intervalo, se for caso disso) para cada tempo de colheita de amostras (C_a expressa em g por kg de massa húmida e de massa seca do corpo inteiro; C_s expressa em g por kg de massa húmida e por kg de massa seca do solo). Se for necessário um fator de acumulação biota-solo (BSAF) (por exemplo, para comparação dos resultados de dois ou mais ensaios realizados em animais com diferentes teores de lípidos), C_a pode também ser expressa em g por kg de lípidos do organismo e C_s pode ser expressa em g por kg de carbono orgânico do solo,

— BAF (expresso em kg de solo por kg de vermes), constante de velocidade de absorção do solo (k_s, expressa em g de solo por kg de vermes por dia) e constante de velocidade de eliminação (k_e, expressa em dia^{-1}); adicionalmente, pode indicar-se o BSAF (expresso em kg de carbono orgânico do solo por kg de lípidos dos vermes),

▼M4

— se tiverem sido medidas: percentagens do produto químico parental, dos metabolitos deste e dos resíduos ligados (ou seja, percentagem do produto químico em estudo que não pode ser extraído por métodos de extração comuns) detetadas no solo e nos animais sujeitos ao ensaio,

— métodos utilizados para as análises estatísticas dos dados.

Avaliação dos resultados:

— coerência dos resultados com os critérios de validade referidos no ponto 17,

— resultados inesperados ou inabituais — por exemplo, eliminação incompleta do produto químico pelos animais sujeitos ao ensaio.

REFERÊNCIAS:

(1) Amorim M. (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ--HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*. Tese de mestrado, Universidade de Coimbra.

(2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm Eisenia fetida and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 pp.

(4) Beek B., Boehling S., Bruckmann U., Franke C., Joehncke U., Studinger G. (2000). The assessment of bioaccumulation. *In* Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, vol. 2, parte J (editordo volume: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(5) Belfroid A., Sikkenk M., Seinen W., Van Gestel C., Hermens J. (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 93-99.

(6) Belfroid A., Van Wezel A., Sikkenk M., Van Gestel C., Seinen W. e Hermens J. (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. *Ecotox. Environ. Safety* 25: 154-165.

(7) Belfroid A., Meiling J., Drenth H., Hermens J., Seinen W., Van Gestel C. (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). *Ecotox. Environ. Safety* 31: 185-191.

(8) Bell AW (1958). The anatomy of Enchytraeus albidus, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. *Ann. Mus. Novitat.* 1902: 1-13.

(9) Bligh E.G. e Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. *Biochem. Pysiol.* 37: 911-917.

(10) Bouche M. (1972). Lombriciens de France. Écologie et Systématique. INRA, Annales de Zoologie-Écologie animale, Paris, 671 p.

(11) Bruns E., Egeler Ph., Moser T., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Relatório à Agência Federal Alemã do Ambiente (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E., Egeler Ph., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). *Hydrobiologia* 463: 185-196.

(13) Conder J.M. e Lanno R.P. (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. *J. Soils Sediments* 3: 13-20.

▼M4

(14) Connell D.W. e Markwell R.D. (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. *Chemosphere* 20: 91-100.

(15) Didden W.A.M. (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37: 2-29.

(16) Didden W. (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert B.A., Breure A.M. e Zechmeister H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., Países Baixos, p. 555-576.

(17) De Boer J., Smedes F., Wells D., Allan A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich D.R., Schmid P., Zweifel U., Schlatter C., Jenni-Eiermann S., Bachmann H., Bühler U., Zbinden N. (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 140-145.

(19) Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de dezembro de 2006, relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH), que cria a Agência Europeia dos Produtos Químicos, que altera a Directiva 1999/45/CE e que revoga o Regulamento (CEE) n.º 793/93 do Conselho e o Regulamento (CE) n.º 1488/94 da Comissão, bem como a Diretiva 76/769/CEE do Conselho e as Diretivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE da Comissão (JO L 396 de 30.12.2006, p. 1).

(20) Edwards C.A. e Bohlen P.J. (1996). Biology and ecology of earthworms. Terceira edição, Chapman & Hall, Londres, 426 pp.

(21) OCDE (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes, Guideline No 315, Guidelines for the testing of chemicals. OCDE, Paris

(22) Egeler Ph., Gilberg D., Scheffczyk A., Moser Th. e Römbke J. (2009). Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten. Relatório à Agência Federal Alemã do Ambiente (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Disponível em: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

(23) Elmegaard N. e Jagers op Akkerhuis G.A.J.M. (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

(24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Relatório de série sobre a proteção do ambiente EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, Normas da EPPO (European Plant Protection Organization), Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* 32: 1897-1905.

(27) Franke C., Studinger G., Berger G., Böhling S., Bruckmann U., Cohors-Fresenborg D., Jöhncke U. (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29: 1501-1514.

(28) Füll C. (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*). Dissertação na Universidade de Mogúncia, 156 pp.

▼M4

(29) Füll C., Schulte C., Kula C. (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF-Z. *Umweltchem, Ökotox.* 15: 78-84.

(30) Gabric A.J., Connell D.W., Bell P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24: 1225-1231.

(31) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A., Parrish C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography* 30: 1099-1105.

(32) Hawker D.W. e Connell D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.

(33) Hund-Rinke K. e Wiechering H. (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. *J. Soils Sediments* 1: 15-20.

(34) Hund-Rinke K., Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. *In*: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden S., Erb R., Dott W., Eisentraeger A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberga, 59-81.

(35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

(36) Jaenike J. (1982). *Eisenia foetida* is two biological species. Megadrilogica 4: 6-8.

(37) Jager T. (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2080-2090.

(38) Jager T., Sanchez P.A., Muijs B., van der Welde E., Posthuma L. (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in Eisenia andrei (*Oligochaeta*) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.

(39) Jager T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A.C., Hogendoorn E.A., De Jong A., Kruitbosch J.A.W., Peijnenburg W.J.G. M. (2003a). *Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*,* Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures*. Environ. Toxicol. Chem.* 22: 767-775.

(40) Jager T., Fleuren R.L.J., Hoogendoorn E., de Korte G. (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (*Oligochaeta*). *Environ. Sci. Technol.* 37: 3399-3404.

(41) Janssen M.P.M., Bruins A., De Vries T.H., Van Straalen N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.

(42) Kasprzak K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23: 217-232.

(43) Khalil A.M. (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertação na Universidade de Munique, 137 pp.

(44) Landrum P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23: 588-595.

(45) Marinussen M.P.J.C., Van der Zee S.E.A.T.M., De Haan F.A. (1997). Cu accumulation in Lumbricus rubellus under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. *Ecotox. Environ. Safety* 36: 17-26.

(46) Mount D.R., Dawson T.D., Burkhard L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus* variegates. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1244-1249.

▼M4

(47) Nendza M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, *In*: R. Nagel e R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlim 1990, VCH, Weinheim.

(48) Capítulo C.8 deste anexo — *Toxicidade em relação às minhocas*.

(49) Capítulo C.13 deste anexo — *Bioconcentração: ensaio dinâmico com peixe*.

(50) Capítulo C.21 deste anexo — *Microorganismos no solo: ensaio de transformação de azoto*.

(51) OCDE (2004a), Enchytraeid reproduction test, *Test Guideline No 220*, *Guidelines for the testing of chemicals*, OCDE, Paris.

(52) OCDE (2004b), *Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida/Eisenia Andrei*)*, *Test Guideline No 222*, *Guidelines for the testing of chemicals*, OCDE, Paris.

(53) OCDE (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, *Test Guideline No 315*, *Diretrizes para os ensaios a produtos químicos*, OCDE, Paris.

(54) Petersen H. e Luxton M. (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388.

(55) Phillips D.J.H. (1993). Bioaccumulation. *In*: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

(56) Pflugmacher J. (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser--Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. *Ökotox.* 4: 77-81.

(57) Posthuma L., Weltje L., Anton-Sanchez F.A. (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* Relatório do RIVM n.º 607506001, Bilthoven.

(58) Randall R.C., Lee II H., Ozretich R.J., Lake J.L., Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ.Toxicol. Chem.* 10: 1431-1436.

(59) Römbke J., Egele P., Füll C. (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke J. e Moser Th. (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.

(61) Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden S., Erb R., Dott W. e Eisentraeger A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberga. 105-129.

(62) Romijn C.A.F.M., Luttik R., Van De Meent D., Slooff W., Canton J.H. (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. *Ecotox. Envir. Safety* 27: 107-127.

(63) Sample B.E., Suter D.W., Beauchamp J.J., Efroymson R.A. (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H.-J. e Riepert F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R. e Collado R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (*Enchytraeide*, *Clitellata*, *Annelida*). *Carolinea* 57: 93–100.

▼M4

(66) Sims R.W. e Gerard B.M. (1985). Earthworms, *In*: Kermack D.M. e Barnes R.S.K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. Londres: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa J.P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M. (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2557–2563.

(68) Spacie A. e Hamelink J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem. 1*, 309-320.

(69) Stephenson G.L., Kaushik A., Kaushik N.K., Solomon K.R., Steele T., Scroggins R.P. (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. *In*: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.

(70) Sterenborg I., Vork N.A., Verkade S.K., Van Gestel C.A.M., Van Straalen N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation – Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlim.

(72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Segunda edição, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(73) Van Brummelen TC e Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.

(74) Van Gestel C.A.M. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, *In*: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H. Edwards, P.J. Greig-Smith, P.W. & Heimbach F.). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel C.A. e Ma W.-C. (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. *Chemosphere* 21: 1023-1033.

(76) Van Straalen N.M., Donker M.H., Vijver M.G., van Gestel C.A.M. (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409-417.

(77) Venter J.M. e Reinecke A.J. (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (*Oligochaeta*). *South African J. Zool.* 23: 161-165.

(78) Vijver M.G., Vink J.P.M., Jager T., Wolterbeek H.T., van Straalen N.M., van Gestel C.A.M. (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm Lumbricus rubellus exposed to contaminated floodplain soil. *Soil Biol, Biochem.* 37: 1843-1851.

(79) Widianarko B. e Van Straalen N.M. (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 402-406.

▼M4

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Bioacumulação é o aumento que a concentração do produto químico em estudo sofre no interior ou à superfície de um organismo, relativamente à concentração do mesmo produto no meio circundante. A bioacumulação resulta dos processos de bioconcentração e bioamplificação (cf. *infra)*.

Bioconcentração é o aumento que a concentração do produto químico em estudo sofre no interior ou à superfície de um organismo, em consequência da absorção do produto exclusivamente a partir do meio circundante (ou seja, através da superfície do corpo e através do solo ingerido), relativamente à concentração do mesmo produto no meio circundante.

Bioamplificação é o aumento que a concentração do produto químico em estudo sofre no interior ou à superfície de um organismo, sobretudo em consequência da absorção de alimentos ou presas contaminados, relativamente à concentração do mesmo produto nesses alimentos ou presas. A bioamplificação pode conduzir à transferência do produto químico para as cadeias alimentares, com acumulação.

Eliminação de um produto químico em estudo é a perda desse produto pelos tecidos do organismo sujeito ao ensaio, mediante processos ativos ou passivos, perda essa que ocorre independentemente da presença ou ausência do produto químico no meio circundante.

Fator de bioacumulação (BAF) em qualquer momento da fase de absorção deste ensaio de bioacumulação é o quociente entre a concentração do produto químico no interior ou à superfície do organismo sujeito ao ensaio (C_a — em g por kg de massa seca de verme) e a concentração do produto químico no meio circundante (C_s — em g por kg de massa seca de solo); as unidades em que se exprime o BAF são kg de solo por kg de verme.

Fator de bioacumulação em estado estacionário (BAF_{ss}) é o BAF em estado estacionário, sem variação significativa ao longo de um período prolongado, mantendo-se constante durante esse período a concentração do produto químico no meio circundante (C_s — em g por kg de massa seca de solo).

O **fator de bioacumulação**, quando calculado diretamente pelo quociente entre a constante de velocidade de absorção do solo e a constante de velocidade de eliminação do solo (k_s e k_e — cf. *infra)*, é designado fator de bioacumulação cinético (BAF_K).

Fator de acumulação biota-solo (BSAF) é o quociente entre a concentração do produto químico em estudo no interior ou à superfície do organismo sujeito ao ensaio, normalizada relativamente ao teor de lípidos, e a concentração do mesmo produto químico no solo, normalizada relativamente ao teor de carbono orgânico, em estado estacionário. C_a é então expressa em g por kg de lípidos do organismo e C_s em g por kg de teor orgânico do solo; as unidades em que se exprime o BSAF são kg de carbono orgânico por kg de lípidos.

Patamar ou **estado estacionário** é o equilíbrio entre os processos de absorção e de eliminação que ocorrem simultaneamente durante a fase de exposição. No gráfico do BAF em função do tempo, o estado estacionário é atingido quando a curva se torna uma linha paralela ao eixo do tempo e três cálculos sucessivos do BAF em amostras colhidas com intervalos de, pelo menos, dois dias não diferem mais de 20 % entre si, sem que haja diferenças significativas entre os três períodos de amostragem. No caso de produtos químicos de absorção lenta, são mais adequados intervalos de sete dias (49).

Coeficiente de partição carbono orgânico-água (K_{oc}) é o quociente entre a concentração de um produto químico no interior ou à superfície da fração de carbono orgânico de um solo e a concentração do mesmo produto químico na água, em condições de equilíbrio.

Coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}, por vezes também representado por P_{ow}), é o quociente entre a solubilidade de um produto químico em n-octanol e a solubilidade do mesmo produto químico na água, em condições de equilíbrio. O logaritmo de K_{ow} ($\log K_{ow}$) é utilizado como indicador do potencial de bioacumulação de produtos químicos em organismos aquáticos.

▼M4

Fase de absorção ou **de exposição** é o período durante o qual os organismos sujeitos ao ensaio estão expostos ao produto químico em estudo.

Constante de velocidade de absorção do solo (k_s) é o valor numérico que define o ritmo (ou taxa) de aumento da concentração do produto químico em estudo no interior ou à superfície do organismo sujeito ao ensaio, em resultado da fase de absorção de solo; k_s é expressa em g de solo por kg de verme por dia.

Fase de eliminação é o período, depois de os organismos sujeitos ao ensaio serem transferidos de um meio contaminado para um meio isento do produto químico em estudo, durante o qual é estudada a eliminação (ou perda líquida) do produto químico por esses organismos.

Constante de velocidade de eliminação (k_e) é o valor numérico que define o ritmo (ou taxa) de redução da concentração do produto químico em estudo no interior ou à superfície do organismo sujeito ao ensaio, depois de o organismo sujeito ao ensaio ser transferido de um meio que contém o produto químico para um meio dele isento; k_e é expressa em dia^{-1}.

Produto químico em estudo é qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M4

Apêndice 2

Cálculo dos parâmetros de absorção e de eliminação

O principal parâmetro final de um ensaio de bioacumulação é o fator de bioacumulação — BAF. O BAF pode ser calculado dividindo a concentração no organismo sujeito ao ensaio, C_a, pela concentração no solo, C_s, em estado estacionário. Se não se atingir o estado estacionário durante a fase de absorção, calcula-se o BAF_K a partir das constantes de velocidade, em vez do BAF_{ss}. Deve, porém, indicar-se se o BAF é ou não baseado nas concentrações em estado estacionário.

O meio habitual para obter o fator de bioacumulação cinético (BAF_K), a constante de velocidade de absorção do solo (k_s) e a constante de velocidade de eliminação (k_e) são métodos informáticos de estimativa de parâmetros não lineares — por exemplo, com base nos modelos descritos na referência (68). Dado um conjunto de dados sequenciais de concentração em função do tempo e as equações de modelo:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(equação 1)}$$

ou

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{(equação 2)}$$

em que

C_a = concentração do produto químico nos vermes [g por kg de massa húmida ou seca]

k_s = constante de velocidade de absorção nos tecidos [g de solo por kg de verme por dia]

C_s = concentração do produto químico no solo [g por kg de massa húmida ou seca]

k_e = constante de velocidade de eliminação [dia^{-1}]

t_c = tempo decorrido até ao final da fase de absorção,

esses programas informáticos calculam os valores de BAF_K, k_s e k_e.

Se a concentração de fundo nos vermes não expostos — por exemplo, no dia 0 — diferir significativamente de zero (pode, por exemplo, ser o caso relativamente aos metais), essa concentração de fundo ($C_{a,0}$) deve ser incluída nas equações, transformando-as em:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{(equação 3)}$$

e

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{(equação 4)}$$

Nos casos em que, durante a fase de absorção, se observa ao longo do tempo um decréscimo significativo da concentração do produto químico no solo, podem utilizar-se os seguintes modelos — p. ex., 67 e 79:

$$C_s = C_0(e^{-k}0^{t}) \qquad \text{(equação 5)}$$

▼M4

em que

C_s = concentração do produto químico no solo [g por kg de massa húmida ou seca]

k_0 = constante de velocidade de degradação no solo [dia^{-1}]

C_0 = concentração inicial do produto químico no solo [g por kg de massa húmida ou seca]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(equação 6)}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{(equação 7)}$$

em que

C_a = concentração do produto químico nos vermes [g por kg de massa húmida ou seca]

k_s = constante de velocidade de absorção nos tecidos [g de solo por kg de verme por dia]

k_0 = constante de velocidade de degradação no solo [dia^{-1}]

k_e = constante de velocidade de eliminação [dia^{-1}]

t_c = tempo decorrido até ao final da fase de absorção.

Se durante a fase de absorção for atingido o estado estacionário (ou seja, se $t = \infty$), a equação 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(equação 1)}$$

pode ser reduzida a:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

ou

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{(equação 8)}$$

Então k_s/k_e x C_s é uma aproximação à concentração do produto químico nos tecidos dos vermes em estado estacionário ($C_{a,ss}$).

O fator de acumulação biota-solo (BSAF) pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{(equação 9)}$$

em que f_{oc} é a fração de carbono orgânico do solo e f_{lip} é a fração de lípidos dos vermes, ambas preferencialmente determinadas em amostras colhidas no âmbito do ensaio e baseadas, ambas, na massa seca ou na massa húmida.

As constantes cinéticas de eliminação podem ser modelizadas utilizando os dados da fase de eliminação e aplicando a equação de modelo *infra* e um método informático de estimativa de parâmetros não lineares. Se o gráfico dos dados em função do tempo indicar um decréscimo exponencial constante da concentração do produto químico nos animais, pode utilizar-se um modelo monocompartimental (equação 9) para descrever a eliminação ao longo do tempo.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{(equação 10)}$$

▼**M4**

Os processos de eliminação revelam-se por vezes bifásicos, com rápido decréscimo de C_a durante as primeiras fases da eliminação e perda mais lenta do produto químico em estudo nas fases posteriores — p. ex., 27 e 68. As duas fases podem ser interpretadas admitindo que há dois compartimentos distintos no organismo, que eliminam a velocidades diferentes o produto químico em estudo. Nestes casos, deve consultar-se literatura específica — p. ex., 38, 39, 40 e 78.

Por meio das equações de modelo *supra,* os parâmetros cinéticos (k_s e k_e) podem também ser calculados de uma só vez aplicando o modelo de cinética de primeira ordem simultaneamente a todos os dados da fase de absorção e da fase de eliminação. Para a descrição de um método que permita esse cálculo combinado das constantes de velocidade de absorção e de eliminação, consultar, por exemplo, as referências 41, 73 e 70.

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \qquad \text{(equação 11)}$$

Nota: Se os parâmetros de absorção e de eliminação forem estimados simultaneamente a partir dos dados combinados de absorção e de eliminação, o "m" que aparece na equação 11 é um descritor que permite ao programa informático associar os subtermos da equação aos conjuntos de dados da fase respetiva e efetuar corretamente os cálculos (m = 1 para a fase de absorção, m = 2 para a fase de eliminação).

Estas equações de modelo devem, porém, ser utilizadas com precaução, em especial se, durante o ensaio, ocorrerem alterações da biodisponibilidade ou da (bio)degradação do produto químico em estudo — p. ex., (79).

▼M4

Apêndice 3

EXEMPLOS DE PROGRAMAÇÃO DE ENSAIOS DE BIOACUMULAÇÃO NO SOLO

Ensaio em minhocas

a) Fase de absorção, com oito datas de colheita de amostras para cálculo dos parâmetros cinéticos

Dia	Atividade
– 6	O solo preparado é condicionado durante 48 h;
– 4	A fração de solo é enriquecida com a solução do produto químico em estudo; deixa-se evaporar os solventes; misturam-se os componentes do solo; distribui-se o solo pelos recipientes de ensaio; estabelece-se o equilíbrio com as condições do ensaio durante quatro dias (três semanas no caso de solo enriquecido com metais);
– 3 a – 1	Os organismos que vão ser sujeitos ao ensaio são separados da cultura, para aclimatação; os componentes do solo são preparados e humedecidos;
0	Mede-se a temperatura e o pH do solo; são retiradas amostras de solo dos recipientes enriquecidos e dos controlos do solvente, para determinar a concentração do produto químico em estudo; adiciona-se ração alimentar; as minhocas são pesadas e distribuídas aleatoriamente pelos recipientes de ensaio; separa-se subamostras suficientes de minhocas para determinar os valores analíticos de fundo, a massa húmida, a massa seca e o teor de lípidos; pesa-se todos os recipientes de ensaio, para verificar o teor de humidade do solo; verifica-se a alimentação de ar, se for utilizado um sistema de ensaio fechado;
1	Verifica-se a alimentação de ar e regista-se o comportamento das minhocas e a temperatura; colhe-se amostras do solo e das minhocas para determinar a concentração do produto químico em estudo;
2	O mesmo que no dia 1;
3	Verifica-se a alimentação de ar, o comportamento das minhocas e a temperatura;
4	O mesmo que no dia 1;
5 - 6	O mesmo que no dia 3;
7	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; repõe-se a água evaporada;
8 - 9	O mesmo que no dia 3;
10	O mesmo que no dia 1;
11 - 13	O mesmo que no dia 3;
14	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; repõe-se a água evaporada;
15 - 16	O mesmo que no dia 3;
17	O mesmo que no dia 1;
18 - 20	O mesmo que no dia 3;

▼**M4**

Dia	Atividade
21	O mesmo que no dia 1; mede-se a temperatura e o pH do solo; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; termina a fase de absorção; transfere-se as minhocas dos replicados expostos restantes para recipientes contendo solo limpo, com vista à fase de eliminação (sem purga do trato digestivo); colhe-se amostras de solo e de minhocas dos controlos do solvente.
	As atividades de pré-exposição (fase de estabelecimento do equilíbrio) devem ser programadas tendo em conta as propriedades do produto químico em estudo.
	As atividades descritas para o dia 3 devem ser executadas diariamente (pelo menos em dias úteis).

b) Fase de eliminação

Dia	Atividade
– 6	Os componentes do solo são preparados e humedecidos; o solo preparado é condicionado durante 48 h;
– 4	Mistura-se os componentes do solo; distribui-se o solo pelos recipientes de ensaio; incuba-se nas condições de ensaio durante 4 dias;
0 (final da fase de absorção)	Mede-se a temperatura e o pH do solo; as minhocas são pesadas e distribuídas aleatoriamente pelos recipientes de ensaio; adiciona-se ração alimentar; transferem-se as minhocas dos replicados expostos restantes para recipientes contendo solo limpo; colhem-se amostras do solo e das minhocas quatro a seis horas mais tarde, para determinar a concentração do produto químico em estudo;
1	Verifica-se a alimentação de ar e regista-se o comportamento das minhocas e a temperatura; colhe-se amostras do solo e das minhocas para determinar a concentração do produto químico em estudo;
2	O mesmo que no dia 1;
3	Verificam-se a alimentação de ar, o comportamento das minhocas e a temperatura;
4	O mesmo que no dia 1;
5 - 6	O mesmo que no dia 3;
7	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; repõe-se a água evaporada;
8 - 9	O mesmo que no dia 3;
10	O mesmo que no dia 1;
11 - 13	O mesmo que no dia 3;
14	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio e compensando a água evaporada;
15 - 16	O mesmo que no dia 3;
17	O mesmo que no dia 1;

▼M4

Dia	Atividade
18 - 20	O mesmo que no dia 3;
21	O mesmo que no dia 1; mede-se a temperatura e o pH do solo; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; colhe-se amostras de solo e de minhocas dos controlos do solvente.
	Antes de se iniciar a fase de eliminação, o solo deve ser preparado do mesmo modo que antes de se iniciar a fase de absorção.
	As atividades descritas para o dia 3 devem ser executadas diariamente (pelo menos em dias úteis).

Ensaio em vermes da família *Enchytraeidae*

a) Fase de absorção, com oito datas de colheita de amostras, para cálculo dos parâmetros cinéticos

Dia	Atividade
– 6	O solo preparado é condicionado durante 48 h;
– 4	A fração de solo é enriquecida com a solução do produto químico em estudo; deixa-se evaporar os solventes; mistura-se os componentes do solo; distribui-se o solo pelos recipientes de ensaio; estabelece-se o equilíbrio com as condições do ensaio durante quatro dias (três semanas no caso de solo enriquecido com metais);
– 3 a – 1	Os organismos que vão ser sujeitos ao ensaio são separados da cultura, para aclimatação; prepara-se e humedece-se os componentes do solo;
0	Mede-se a temperatura e o pH do solo; colhe-se amostras de solo dos recipientes enriquecidos e dos controlos do solvente, para determinar a concentração do produto químico em estudo; adiciona-se ração alimentar ao solo; os vermes são pesados e distribuídos aleatoriamente pelos recipientes de ensaio; separa-se subamostras suficientes de vermes para determinar os valores analíticos de fundo, a massa húmida, a massa seca e o teor de lípidos; pesa-se todos os recipientes de ensaio, para verificar o teor de humidade do solo; verifica-se a alimentação de ar, se for utilizado um sistema de ensaio fechado;
1	Verifica-se a alimentação de ar e regista-se o comportamento dos vermes e a temperatura; colhe-se amostras do solo e dos vermes, para determinar a concentração do produto químico em estudo;
2	O mesmo que no dia 1;
3	Verifica-se a alimentação de ar, o comportamento dos vermes e a temperatura;
4	O mesmo que no dia 1;
5 - 6	O mesmo que no dia 3;
7	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar ao solo; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes; repõe-se a água evaporada;
9	O mesmo que no dia 1;
10	O mesmo que no dia 3;

▼**M4**

Dia	Atividade
11	O mesmo que no dia 1;
12 - 13	O mesmo que no dia 3;
14	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar ao solo; mede-se a temperatura e o pH do solo; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; termina a fase de absorção; transfere-se os vermes dos replicados expostos restantes para recipientes contendo solo limpo, com vista à fase de eliminação (sem purga do trato digestivo); colhe-se amostras de solo e de vermes dos controlos do solvente.
	As atividades de pré-exposição (fase de estabelecimento do equilíbrio) devem ser programadas tendo em conta as propriedades do produto químico em estudo.
	As atividades descritas para o dia 3 devem ser executadas diariamente (pelo menos em dias úteis).

▼M4

Apêndice 4

Solo artificial — recomendações de preparação e armazenagem

Dado que podem não estar disponíveis ao longo de todo o ano solos naturais de uma determinada origem e que a presença de organismos indígenas e de micropoluentes pode influenciar o ensaio, recomenda-se para este um substrato artificial, o solo artificial a que se refere o capítulo C.8 deste anexo — *Toxicidade em relação às minhocas* (48). Várias espécies cobaias podem sobreviver, desenvolver-se e reproduzir-se neste solo, garantindo-se uma estandardização máxima e a comparabilidade intralaboratorial e interlaboratorial das condições de ensaio e de cultura.

Componentes do solo

Turfa:	10 %	Turfa de *Sphagnum*, em conformidade com o *Test Guideline 207* da OCDE (48);
Areia quartzítica:	70 %	Areia quartzítica industrial (seca ao ar); granulometria: mais de 50 % das partículas devem situar-se no intervalo 50-200 μm, mas todas devem ser ≤ 2 mm;
Argila caulinítica:	20 %	Teor de caulinite ≥ 30 %;
Carbonato de cálcio:	≤ 1 %	$CaCO_3$, pulverizado, quimicamente puro.

Opcionalmente, pode reduzir-se o teor de carbono orgânico do solo artificial — por exemplo, baixando o teor de turfa para 4-5 % do solo seco e subindo correspondentemente o teor de areia. Com esta redução do teor de carbono orgânico, podem diminuir-se as possibilidades de adsorção do produto químico em estudo ao solo (carbono orgânico) e pode favorecer-se a disponibilização do produto aos vermes (74). Foi demonstrado que as espécies *Enchytraeus albidus* e *Eisenia fetida* podem cumprir os critérios de validade relativos à reprodução quando sujeitas a ensaio em solos naturais com teor de carbono orgânico inferior — p. ex., 2,7 % (33)(61). A experiência adquirida revela que o mesmo se pode também conseguir em solo artificial com 5 % de turfa.

Preparação

Os componentes secos do solo são misturados cuidadosamente (por exemplo, num misturador laboratorial grande). Esta operação deve ser executada cerca de uma semana antes do início do ensaio. Depois de misturados, os componentes secos devem ser humedecidos com água desionizada pelo menos 48 horas antes da aplicação do produto químico em estudo, a fim de equilibrar ou estabilizar a acidez. Para determinar o pH, utiliza-se uma mistura 1:5 de solo com uma solução 1 M de KCl. Se o valor do pH não estiver dentro do intervalo requerido (6,0 ± 0,5), adiciona-se ao solo uma quantidade suficiente de $CaCO_3$ ou prepara-se um novo lote de solo.

A capacidade máxima de retenção de água do solo artificial é determinada de acordo com a norma ISO 11268-2 (35). Pelo menos dois dias antes do início do ensaio, o solo artificial seco é humedecido, adicionando água desionizada ou reconstituída até se obter aproximadamente metade do teor final de água. O teor final de água deve situar-se entre 40 % e 60 % da capacidade máxima de retenção de água. No início do ensaio, o solo previamente humedecido é dividido em tantos lotes quantas as concentrações e os controlos utilizados no ensaio, e o teor de humidade é ajustado para 40 % a 60 % da capacidade máxima de retenção de água com a solução do produto químico em estudo e/ou adicionando água desionizada ou reconstituída. O teor de humidade é determinado no início e no final do ensaio (a 105 °C). Deve ser o teor ótimo para a espécie sujeita ao ensaio (o teor de humidade pode também ser verificado do seguinte modo: espremendo o solo delicadamente na mão, devem aparecer pequenas gotas de água entre os dedos).

▼M4

Armazenagem

Os componentes secos do solo artificial podem ser armazenados à temperatura ambiente do laboratório até à sua utilização. O solo preparado e previamente humedecido pode ser armazenado em local fresco até três dias antes do seu enriquecimento; deve minimizar-se a evaporação de água. O solo enriquecido com o produto químico em estudo deve ser utilizado de imediato, a menos que haja indicações de que o solo em questão pode ser armazenado sem afetar a toxicidade e a biodisponibilidade do produto químico em causa. Podem então ser armazenadas amostras do solo enriquecido, respeitando as condições recomendadas para o produto químico em estudo, até à realização das análises.

▼M4

Apêndice 5

Espécies de oligoquetas terrestres recomendadas para ensaios de bioacumulação no solo

Minhocas

A espécie recomendada para os ensaios é a *Eisenia fetida* (Savigny 1826), pertencente à família *Lumbricidae* e dividida desde 1972 em duas subespécies — *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* (10). Segundo Jaenike (36), trata-se de duas espécies separadas. A *Eisenia fetida* é facilmente identificável pelas listras amarelas brilhantes intersegmentais, ao passo que a *Eisenia andrei* tem cor vermelha escura uniforme. Originárias provavelmente da região do Mar Negro, estão hoje distribuídas por todo o mundo, sobretudo em *habitats* antropogenicamente modificados, como as montureiras de compostagem. Ambas podem ser utilizadas para ensaios ecotoxicológicos e de bioacumulação.

A *Eisenia fetida* e a *E. andrei* são comercializadas, por exemplo, como isco para pesca. Em comparação com outros vermes da família *Lumbricidae*, têm um ciclo de vida curto, atingindo a maturidade por volta dos 2 ou 3 meses (à temperatura ambiente do laboratório). A temperatura ótima para elas é de 20 a 24 °C. Preferem substratos relativamente húmidos, com pH próximo da neutralidade e teor elevado de matéria orgânica. Como estas espécies têm sido amplamente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos estandardizados desde há uns 25 anos, a sua criação em cultura está bem estabelecida (48)(77).

Ambas as espécies podem ser cultivadas numa ampla gama de resíduos de origem animal. O meio de cultura recomendado pela ISO é uma mistura 50:50 de esterco de cavalo ou de bovino com turfa (35). O meio deve ter um pH de 6 a 7 (regulado com carbonato de cálcio) e baixa condutividade iónica (menos de 6 mS/cm ou menos de 0,5 % de concentração salina) e não deve estar excessivamente contaminado com amoníaco ou urina. Pode também ser utilizado um solo comercial para jardinagem, sem aditivos, solo artificial correspondente à norma da OCDE (48) ou uma mistura 50:50 de ambos. O substrato deve estar húmido, mas não encharcado. São adequadas caixas de cultura de 10 a 50 litros.

Para obter minhocas de idade e massa normalizadas, é melhor iniciar a cultura com casulos de ovos. Por conseguinte, junta-se minhocas adultas a uma caixa de cultura com substrato fresco, para produzir casulos. A experiência demonstra que uma densidade populacional próxima dos 100 vermes adultos por kg de substrato (massa húmida) conduz a boas taxas de reprodução. Ao cabo de 28 dias, retira-se as minhocas adultas. Os vermes provenientes da eclosão dos ovos são utilizados nos ensaios quando atingem a maturidade, ou seja, a partir dos dois meses de idade, mas não ultrapassando os 12 meses.

Os vermes destas duas espécies podem ser considerados saudáveis se se movimentarem através do substrato, não tentarem abandoná-lo e se reproduzirem continuamente. Movimentos muito lentos ou um posterior de cor amarelada (no caso da *Eisenia fetida*) indicam exaustão do substrato. Nesse caso, recomenda-se substrato fresco e/ou um número mais reduzido de animais por caixa.

Referências selecionadas adicionais

Gerard B.M. (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 *Lumbricidae*. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O. (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J., Egeler P., Füll C. (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S. (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. *Oikos* 28: 49-55.

Satchell J.E. (1955). Some aspects of earthworm ecology. *Soil Zoology* (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims R.W. e Gerard B.M. (1985). A synopsis of the earthworms. *Linnean Soc. London* 31: 1-171.

Tomlin A.D. (1984). The earthworm bait market in North America. *In*: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell J.E. (ed.), Chapman & Hall, Londres. 331-338 pp.

Vermes da família *Enchytraeidae*

A espécie recomendada para os ensaios é a *Enchytraeus albidus* (Henle 1837), uma das maiores da família *Enchytraeidae* de anelídeos oligoquetas (pode atingir 15 mm) e com distribuição mundial — p. ex., 8. A *Enchytraeus albidus* encontra-se em *habitats* marinhos, limosos ou terrestres, sobretudo em matéria orgânica em decomposição (algas, produtos de compostagem) e raramente em prados (42). Esta ampla tolerância ecológica e algumas variações morfológicas indicam que poderá haver diversas raças ou subespécies.

A *Enchytraeus albidus* é comercializada como alimento para peixes. Deve verificar-se se a cultura está contaminada por outras espécies, normalmente menores (60). Se houver contaminação, lavam-se todos os vermes numa placa de Petri e selecionam-se em seguida, por meio de um estereomicroscópio, grandes espécimes adultos de *Enchytraeus albidus*, para iniciar uma nova cultura. Rejeitam-se todos os restantes indivíduos. O ciclo de vida da espécie é curto, pois a maturidade é atingida entre os 33 dias (a 18 °C) e os 74 dias (a 12 °C). Somente culturas mantidas no laboratório sem problemas durante pelo menos cinco semanas (uma geração) devem ser utilizadas nos ensaios.

Há outras espécies do género *Enchytraeus* igualmente adequadas, com destaque para a *Enchytraeus luxuriosus,* que tem o seu *habitat* verdadeiramente no solo e que foi descrita pela primeira vez na referência (65). Se forem utilizadas outras espécies de *Enchytraeus*, importa identificá-las claramente e justificar a seleção.

A *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992) é uma espécie pertencente ao mesmo grupo da *Enchytraeus luxuriosus*. Não está provado que ocorra no campo, tendo sido descrita apenas em culturas de minhocas e montureiras de compostagem (Römbke 2003). Por conseguinte, desconhece-se as suas exigências ecológicas originais. Contudo, estudos laboratoriais recentes em vários solos naturais confirmaram que esta espécie tem uma tolerância ampla em relação a propriedades do solo como o pH e a textura (Jänsch *et al.* 2005). Em anos recentes, foi frequentemente utilizada em estudos ecotoxicológicos, dada a simplicidade da sua criação e da sua sujeição a ensaio (p. ex., Kuperman *et al.* 2003). É, porém, pequena (3-12 mm, com 7 mm em média — Westheide e Müller 1996), o que dificulta a sua manipulação, a comparar com a *Enchytraeus albidus*. Se esta espécie for utilizada em vez da *Enchytraeus albidus*, o recipiente de ensaio pode ser menor. Por outro lado, deve ter-se em conta que esta espécie se reproduz muito rapidamente, tendo um período de geração inferior a 20 dias a 20 ± 2 °C (Achazi *et al.* 1999) ou mesmo mais curto se a temperatura for mais elevada.

Os vermes da espécie *Enchytraeus albidus* (bem como de outras espécies congéneres) podem ser criados em grandes caixas de plástico (por exemplo, de 30 × 60 × 10 cm ou de 20 × 12 × 8 cm, as dimensões adequadas para a cultura de vermes de pequeno tamanho), cheias com uma mistura de solo artificial e de solo para jardinagem, não contaminado e sem aditivos. O material de compostagem deve ser evitado, pois pode conter produtos químicos tóxicos, como metais pesados. Antes da utilização, deve remover-se qualquer fauna do solo de cultura, mediante três ciclos de ultracongelamento. Pode também utilizar-se solo artificial puro, mas a taxa de reprodução poderá ser mais lenta, em comparação com a obtida com substratos mistos. O substrato deve ter um pH de 6,0 ± 0,5. A cultura é mantida numa incubadora à temperatura de 15 ± 2 °C, sem luz. Devem evitar-se sempre temperaturas superiores a 23 °C. O solo, artificial ou natural, deve estar húmido, mas não encharcado. Pressionando o solo suavemente com a mão, devem aparecer apenas gotículas de água. Devem evitar-se sempre condições anóxicas (por exemplo, se se utilizar uma tampa, esta deve ter orifícios em número suficiente para uma boa renovação do ar). Deve arejar-se o solo da cultura, mexendo-o cuidadosamente uma vez por semana.

▼M4

Os vermes devem ser alimentados pelo menos uma vez por semana, *ad libitum*, com flocos de aveia, que se colocam numa cavidade da superfície e se cobrem em seguida com solo. Se no recipiente restar alimento da última ministração, a quantidade distribuída deve ser ajustada em conformidade. Se se tiverem desenvolvido fungos, o alimento restante deve ser substituído por uma nova porção de flocos. A fim de estimular a reprodução, a aveia pode ser complementada, de duas em duas semanas, com proteínas em pó enriquecidas com vitaminas (à venda no comércio). Ao cabo de três meses, os animais são transferidos para uma cultura ou um substrato de reprodução, recentemente preparados. Os flocos de aveia, que têm de ser guardados em recipientes herméticos, devem ser tratados em autoclave ou aquecidos antes da sua ministração, para evitar infeções por ácaros — p. ex., *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina, ou *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina. Após a desinfeção, os flocos são moídos, para poderem ser facilmente espalhados na superfície do solo. Uma outra fonte possível de alimento é o fermento de padaria ou a comida para peixes TetraMin®.

Em geral, as condições de cultura são satisfatórias se os vermes não tentarem abandonar o substrato, se movimentarem rapidamente através do solo, exibirem uma superfície externa brilhante, sem partículas de solo pegadas, e tiverem uma coloração mais ou menos esbranquiçada e se forem visíveis vermes de diferentes idades. Na verdade, os vermes podem ser considerados saudáveis se se reproduzirem continuamente.

Referências selecionadas adicionais

Achazi R.K., Fröhlich E., Henneken M., Pilz C. (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (*Enchytraeidae*, *Oligochaeta*). Newsletter on *Enchytraeidae* 6: 117-126.

Jänsch S., Amorim M.J.B., Römbke J. (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. *Environ. Reviews* 13: 51-83.

Kuperman R.G., Checkai R.T., Simini M., Phillips C.T., Kolakowski J.E., Kurnas C.W., Sunahara G.I. (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Enchytraeidae*) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. *Pedobiologia* 47: 651-656.

Römbke J. (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. *Pedobiologia* 47: 607-616.

Westheide W. e Graefe U. (1992). Two new terrestrial Enchytraeus species (*Oligochaeta*, *Annelida*). *J. Nat. Hist.* 26: 479-488.

Westheide W. e Müller M.C. (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. *Hydrobiologia* 334: 263-267.