

REGULAMENTO (UE) N.º 1152/2010 DA COMISSÃO**de 8 de Dezembro de 2010****que altera, tendo em vista a adaptação ao progresso técnico, o Regulamento (CE) n.º 440/2008 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 dos produtos químicos (REACH)****(Texto relevante para efeitos do EEE)**

A COMISSÃO EUROPEIA,

Tendo em conta o Tratado sobre o Funcionamento da União 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 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 ⁽¹⁾, nomeadamente o artigo 13.º, n.º 3,

Considerando o seguinte:

- (1) O Regulamento (CE) n.º 440/2008 da Comissão ⁽²⁾ estabelece os métodos de ensaio a aplicar para os fins do Regulamento (CE) n.º 1907/2006 com vista à determinação das propriedades físico-químicas, da toxicidade e da ecotoxicidade das substâncias.
- (2) A fim de reduzir o número de animais utilizados para fins experimentais, em conformidade com a Directiva 86/609/CEE do Conselho, de 24 de Novembro de 1986, relativa à aproximação das disposições legislativas, regu-

lamentares e administrativas dos Estados-Membros respeitantes à protecção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos ⁽³⁾, é necessário actualizar o Regulamento (CE) n.º 440/2008 aditando, com carácter prioritário, dois novos métodos de ensaio *in vitro* de irritação ocular adoptados recentemente pela OCDE. Consultaram-se as partes interessadas sobre o presente projecto.

- (3) O Regulamento (CE) n.º 440/2008 deve, portanto, ser alterado em conformidade.
- (4) As medidas previstas no 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

São aditados ao anexo, parte B, do Regulamento (CE) n.º 440/2008 os capítulos B.47 e B.48 constantes do anexo do presente regulamento.

*Artigo 2.º*O presente regulamento entra em vigor no terceiro dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial da União Europeia*.

O presente regulamento é obrigatório em todos os seus elementos e directamente aplicável em todos os Estados-Membros.

Feito em Bruxelas, em 8 de Dezembro de 2010.

Pela Comissão
O Presidente
José Manuel BARROSO

⁽¹⁾ JO L 396 de 30.12.2006, p. 1.⁽²⁾ JO L 142 de 31.5.2008, p. 1.⁽³⁾ JO L 358 de 18.12.1986, p. 1.

ANEXO

«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 na *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).
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 indicem.
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).
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) $\geq 1\ 100\ \mu\text{m}$; de bovinos com menos de cinco anos, têm geralmente um eixo horizontal inferior a 28,5 mm e CCT $< 900\ \mu\text{m}$ (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 estreptomomicina a 100 mg/ml – ao HBSS utilizado para mergulhar os olhos durante o transporte).
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.
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.

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.

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 µl, 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.

Crítérios de decisão

44. Consideram-se corrosivas ou fortemente irritantes as substâncias que apresentem $IVIS \geq 55,1$. 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.

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 \pm 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.
- 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_tmter.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).
- 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

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 «opacómetro».

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 mantém 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).

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. $IVIS = \text{valor médio de opacidade} + (15 \times \text{valor médio de permeabilidade})$.

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 fotoelétrica. 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 fotoelétrica e compara-se com a luz igualmente enviada para uma célula fotoelétrica através do compartimento experimental, que compreende a câmara na qual se colocou a córnea. O dispositivo compara a luz transmitida para as células fotoelétricas, determina a diferença e exhibe 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.

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuamente 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.

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) contém 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 <i>in vivo</i> (²)	Classificação <i>in vitro</i> (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-Metilacetato 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
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).

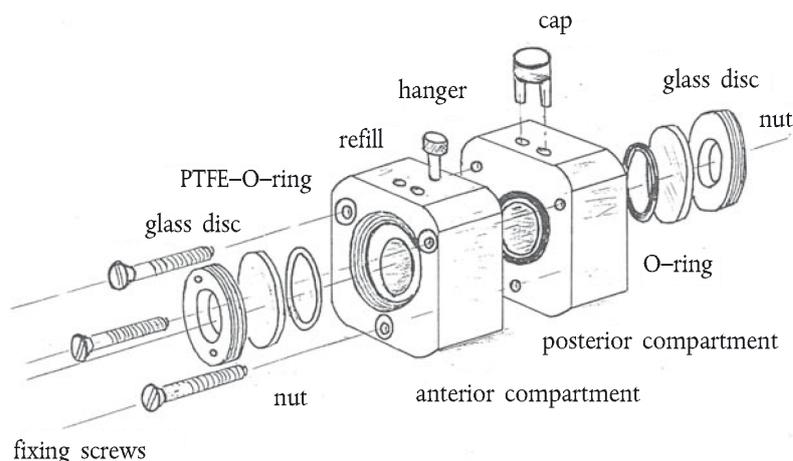
(³) Com base nos resultados obtidos pelos métodos BCOP e ICE.

Apêndice 3

SUPORTE DE CórNEA PARA O ENSAIO BCOP

- 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.

(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.



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.

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 fotoelétrica e compara-se com a luz igualmente enviada para uma célula fotoelétrica através do compartimento experimental, que compreende a câmara na qual se colocou a córnea. O dispositivo compara a luz transmitida para as células fotoelétricas, determina a diferença e exhibe 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 fotoelétrica 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 $\pm 5\%$.

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).
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 tensoactivas (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 indicem.
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).

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 $\leq 0,5$), 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.

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 termostatzadas a $32 \pm 1,5$ °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.
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.
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:

$$\left(\frac{\text{espessura da córnea em } t - \text{espessura da córnea em } = 0}{\text{espessura da córnea em } = 0} \right) \times 100$$

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

Pontuação	Observações
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

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

Valor médio de edema da córnea (%) (*)	Classe ICE
> 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.

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 tensoactivas) 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*)

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;

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
- 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. Intera-gency 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 Health-care 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.
- 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

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 mantém 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).

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 continuamente 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.

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.

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 <i>in vivo</i> (²)	Classificação <i>in vitro</i> (³)
Cloreto de benzalcó-nio (5 %)	8001-54-5	Sal de amónio quaternário	Líquida	Categoria 1	Corrosivo/Fortemente irritante
Clorexidina	55-56-1	Amina, Amida	Sólida	Categoria 1	Corrosivo/Fortemente irritante
Ácido dibenzoil-L-tar-tárico	2743-38-6	Ácido carbo-xílico, Éster	Sólida	Categoria 1	Corrosivo/Fortemente irritante
Imidazole	288-32-4	Composto he-terocíclico	Sólida	Categoria 1	Corrosivo/Fortemente irritante
Ácido tricloroacético (30 %)	76-03-9	Ácido carbo-xílico	Líquida	Categoria 1	Corrosivo/Fortemente irritante
Cloreto de 2,6-diclo-robzenzoflo	4659-45-4	Halogeneto de acilo	Líquida	Categoria 2A	Não-corrosivo/Não forte-mente irritante
2-Metilacetoacetato de etilo	609-14-3	Cetona, Éster	Líquida	Categoria 2B	Não-corrosivo/Não forte-mente irritante
Nitrato de amónio	6484-52-2	Sal inorgânico	Sólida	Categoria 2A	Não-corrosivo/Não forte-mente irritante
Glicerol	56-81-5	Álcool	Líquida	Não atribuída	Não-corrosivo/Não forte-mente irritante
n-Hexano	110-54-3	Hidrocarbo-neto (acíclico)	Líquida	Não atribuída	Não-corrosivo/Não forte-mente 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.

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)

