

## II

(Atos não legislativos)

## REGULAMENTOS

## REGULAMENTO (UE) N.º 260/2014 DA COMISSÃO

de 24 de janeiro de 2014

**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 Diretiva 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 Diretiva 76/769/CEE do Conselho e as Diretivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE da Comissão <sup>(1)</sup>, nomeadamente o artigo 13.º, n.º 3,

Considerando o seguinte:

- (1) O Regulamento (CE) n.º 440/2008 da Comissão <sup>(2)</sup> 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 Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais

utilizados para fins científicos <sup>(3)</sup>, e com a Diretiva 86/609/CEE do Conselho, de 24 de novembro de 1986, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas dos Estados-Membros respeitantes à proteção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos <sup>(4)</sup>, é necessário atualizar o Regulamento (CE) n.º 440/2008 de modo a nele incluir, com caráter prioritário, determinados métodos de ensaio alternativos, atualizados e novos, adotados recentemente pela OCDE.

- (3) A adaptação abrange dois métodos para determinação de propriedades físico-químicas, incluindo uma atualização do método de ensaio da hidrossolubilidade e um novo método de ensaio do coeficiente de partição, aplicável na avaliação das propriedades de persistência, bioacumulação e toxicidade (PBT); quatro métodos novos e um método atualizado para determinação da ecotoxicidade e do comportamento e destino no ambiente; nove métodos para determinação da toxicidade e de outros efeitos na saúde, incluindo quatro métodos de ensaio relativos à toxicidade por inalação (atualização de três métodos e um método novo para reduzir o número de animais utilizados e para melhorar a avaliação dos efeitos), uma atualização do método de ensaio da toxicidade oral por dose repetida a 28 dias, para incluir parâmetros de avaliação da atividade endócrina, uma atualização do método de ensaio da toxicocinética, importante para a conceção e compreensão dos estudos toxicológicos, e uma atualização dos métodos de ensaio da toxicidade crónica, da carcinogenicidade e destes dois efeitos combinados.
- (4) O Regulamento (CE) n.º 440/2008 deve, portanto, ser alterado em conformidade.
- (5) 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,

<sup>(1)</sup> JO L 396 de 30.12.2006, p. 1.

<sup>(2)</sup> JO L 142 de 31.5.2008, p. 1.

<sup>(3)</sup> JO L 276 de 20.10.2010, p. 33.

<sup>(4)</sup> JO L 358 de 18.12.1986, p. 1.

ADOTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

*Artigo 1.º*

O anexo do Regulamento (CE) n.º 440/2008 é alterado de acordo com o 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 diretamente aplicável em todos os Estados-Membros.

Feito em Bruxelas, em 24 de janeiro de 2014.

*Pela Comissão*  
*O Presidente*  
José Manuel BARROSO

---

## ANEXO

O anexo do Regulamento (CE) n.º 440/2008 é alterado do seguinte modo:

- 1) O capítulo A.6 passa a ter a seguinte redação:

**«A.6. SOLUBILIDADE EM ÁGUA**

**INTRODUÇÃO**

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

**CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

2. A hidrossolubilidade das substâncias pode ser consideravelmente afetada pela presença de impurezas. Este método serve para determinar a hidrossolubilidade de substâncias essencialmente puras, estáveis na água e não voláteis. Antes de determinar a hidrossolubilidade, é útil dispor de alguns elementos prévios sobre a substância em estudo, tais como a fórmula estrutural, a pressão de vapor, a constante de dissociação e a hidrólise em função do pH.
3. São descritos neste método de ensaio dois métodos distintos, que se destinam a solubilidades respetivamente inferiores e superiores a  $10^{-2}$  g/l: o método de eluição em coluna e o método do balão. É descrito igualmente um ensaio preliminar, que permite determinar a quantidade aproximada de amostra adequada para o ensaio final, bem como o tempo necessário para a saturação.

**DEFINIÇÕES E UNIDADES**

4. A hidrossolubilidade de uma substância é a concentração mássica de saturação da substância em água a uma dada temperatura.
5. A hidrossolubilidade exprime-se em massa de soluto por volume de solução. A unidade SI é o  $\text{kg/m}^3$ , mas também pode utilizar-se o g/l.

**PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA**

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

**DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS**

**Condições de realização dos ensaios**

7. Os ensaios realizam-se, de preferência, à temperatura de  $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Deve manter-se a temperatura escolhida constante em todas as partes importantes do equipamento.

**Ensaio preliminar**

8. Numa proveta graduada de 10 ml com tampa de vidro, adicionam-se sucessivamente volumes crescentes de água, à temperatura ambiente, a aproximadamente 0,1 g de amostra (é necessário pulverizar as substâncias sólidas). Após cada adição de água, agita-se a mistura durante 10 minutos e verifica-se visualmente se resta amostra por dissolver. Se, após a adição de 10 ml de água, a amostra ou parte dela ainda não se tiver dissolvido, prossegue-se a experiência numa proveta graduada de 100 ml. A solubilidade aproximada é dada na tabela 1, por debaixo do volume de água que solubiliza completamente a amostra. Quando a solubilidade é baixa, o tempo necessário para dissolver a substância em estudo pode ser longo, devendo aguardar-se pelo menos 24 horas. Se, após 24 horas, a substância em estudo ainda não se tiver dissolvido, deve esperar-se mais tempo (até 96 horas) ou experimentar-se uma diluição maior, para verificar se deve utilizar-se o método de eluição em coluna ou o método do balão.

Quadro 1

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

### Método de eluição em coluna

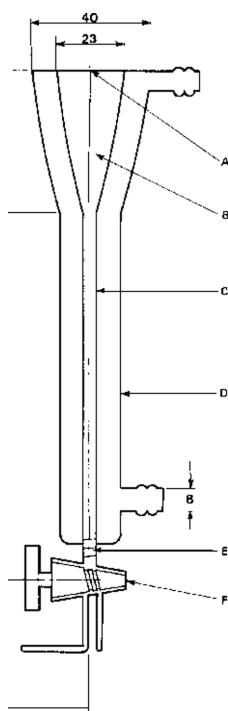
#### Princípio

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

#### Material e aparelhagem

10. É necessária uma microcoluna (figura 1) mantida a temperatura constante, ligada a uma bomba de recirculação (figura 2) ou a um reservatório de nível (figura 3). O enchimento inerte que a microcoluna contém é mantido no lugar por um pequeno tampão de fibra de vidro, que também serve para reter as partículas presentes. Pode utilizar-se como enchimento esférulas de vidro, terra de diatomáceas ou outros materiais inertes.
11. A microcoluna ilustrada na figura 1 é adequada para funcionar com uma bomba de recirculação. Tem uma parte superior de volume correspondente a cinco vezes o volume do leito (descartado no início do ensaio) mais o volume de cinco amostras (retiradas para análise durante o ensaio). O volume da cabeça da coluna pode ser menor se for possível adicionar água ao sistema durante o ensaio, em substituição do volume inicial removido com as impurezas, equivalente a cinco vezes o volume do leito. Liga-se a coluna com tubagem de material inerte a uma bomba de recirculação capaz de debitar cerca de 25 ml/h. Esta pode ser, por exemplo, uma bomba peristáltica ou uma bomba de membrana. É necessário garantir que o material das tubagens não provoca contaminações nem nele há adsorções.
12. A figura 3 ilustra uma montagem com um reservatório de nível, na qual a microcoluna dispõe de uma torneira de via única. A ligação ao reservatório de nível consiste numa junta de vidro esmerilado e em tubagem de material inerte. O caudal proveniente desse reservatório deve ser de aproximadamente 25 ml/h.

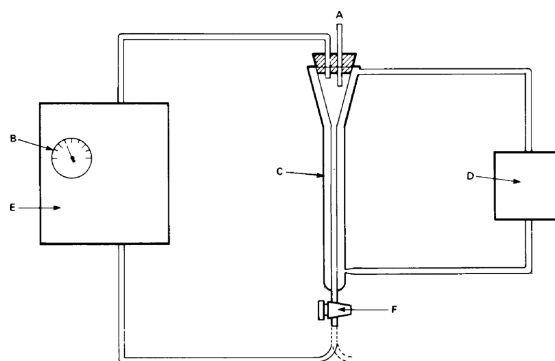
Figura 1



Dimensões em mm

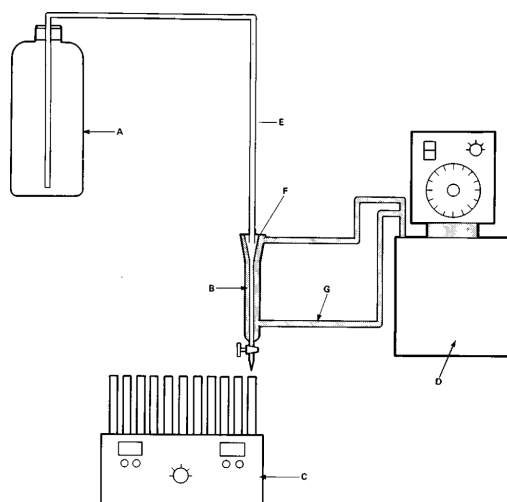
- A. Junta de vidro esmerilado
- B. Parte superior
- C. Diâmetro interior (5)
- D. Diâmetro exterior (19)
- E. Tampão de fibra de vidro
- F. Torneira

Figura 2



- A. Saída para equilíbrio atmosférico
- B. Medidor de caudal
- C. Microcoluna
- D. Bomba de circulação termostaticada
- E. Bomba de recirculação
- F. Torneira de duas vias para recolha das amostras

Figura 3



- A. Reservatório de nível (por exemplo, frasco de reagentes com 2,5 l)
  - B. Coluna
  - C. Recetor de frações
  - D. Termóstato
  - E. Tubagem de Teflon
  - F. Junta de vidro esmerilado
  - G. Tubagem de circulação de água (entre o termóstato e a coluna; diâmetro interno: aproximadamente 8 mm)
13. Transfere-se aproximadamente 600 mg de material de enchimento para um balão de fundo redondo de 50 ml. Dissolve-se num solvente volátil de qualidade para análise uma quantidade adequada da substância em estudo e adiciona-se ao material de enchimento uma quantidade adequada desta solução. Evapora-se completamente o solvente, utilizando, por exemplo, um evaporador rotativo. Caso contrário, não se conseguirá manter o enchimento saturado com água durante a eluição, devido a efeitos de partição à superfície. Uma vez impregnado como se descreveu com a substância em estudo, embebe-se o material de enchimento com cerca de 5 ml de água, durante duas horas, e transfere-se a seguir a suspensão para a microcoluna. Em alternativa, pode introduzir-se o material de enchimento, impregnado como se descreveu com a substância em estudo, na microcoluna já com água, deixando depois em repouso durante duas horas para se atingir o equilíbrio.

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

*Processo com bomba de recirculação*

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

*Processo com reservatório de nível*

16. Recolhem-se frações sucessivas de efluído e analisam-se pelo método escolhido. Para determinar a solubilidade utilizam-se frações provenientes da eluição intermédia, na qual as concentrações de, pelo menos, cinco frações consecutivas não diferem umas das outras mais de  $\pm 30\%$ .
17. O eluente preferível é água bidestilada. Também pode utilizar-se água desionizada de resistividade superior a 10 megaohms/cm e teor total de carbono de origem biológica inferior a 0,01 %.
18. Em ambos os processos, procede-se a uma repetição da sequência descrita com metade do caudal inicial. Se os resultados das duas séries forem coincidentes, considera-se o ensaio satisfatório. Se a solubilidade medida com o caudal menor for superior, reduzir-se-á sucessivamente o caudal a metade, até se obter a mesma solubilidade em duas séries consecutivas.
19. Em ambos os processos, verifica-se se as frações contêm matérias coloidais por observação do efeito de Tyndall. A presença de partículas invalida o ensaio, que deve repetir-se depois de melhorada a ação filtrante da coluna.
20. Mede-se o pH de cada amostra, de preferência com bandas indicadoras próprias.

**Método do balão**

*Princípio*

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

*Material e aparelhagem*

22. É necessário o seguinte:

- utensílios de vidro e aparelhagem de uso corrente em laboratório,
- dispositivo para agitação das soluções em condições termostáticas,
- se necessário (para emulsões), uma centrífuga, de preferência termostaticada,
- equipamento de análise.

*Procedimento*

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

menos nos dois últimos recipientes não diferirem entre si mais de 15 %, o ensaio é satisfatório. Se os resultados obtidos para os recipientes 1, 2 e 3 mostrarem uma tendência crescente, repete-se todo o ensaio, utilizando tempos de equilibragem maiores.

24. O ensaio também pode efetuar-se sem o período prévio a 30 °C. Para verificar se já se estabeleceu o equilíbrio de saturação, vai-se colhendo amostras até que o tempo de agitação deixe de influenciar as concentrações medidas.
25. Mede-se o pH de cada amostra, de preferência com bandas indicadoras próprias.

#### **Determinações analíticas**

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

#### **DADOS E RELATÓRIOS**

##### **Dados**

##### *Método de eluição em coluna*

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

##### *Método do balão*

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

#### **Relatório dos ensaios**

##### *Método de eluição em coluna*

29. Elementos a constar do relatório dos ensaios:

- resultados do ensaio preliminar,
- identidade química e impurezas (eventual etapa preliminar de purificação),
- concentração, caudal e pH correspondentes a cada amostra,
- média e desvio-padrão de, pelo menos, cinco amostras do patamar de saturação de cada série,
- média de, pelo menos, duas séries consecutivas,
- temperatura da água durante o processo de saturação,
- método de análise,
- material de enchimento,
- impregnação do material de enchimento,
- solvente utilizado,
- indícios de eventual instabilidade química da substância durante o ensaio,
- todas as informações importantes para a interpretação dos resultados, especialmente no que respeita a impurezas e ao estado físico da substância em estudo.

##### *Método do balão*

30. Elementos a constar do relatório dos ensaios:

- resultados do ensaio preliminar,
- identidade química e impurezas (eventual etapa preliminar de purificação),

- cada uma das determinações analíticas — e o respetivo valor médio, no caso de se ter determinado mais de um valor para cada balão,
- pH de cada amostra,
- média dos valores correspondentes aos balões concordantes,
- temperatura do ensaio,
- método analítico,
- indícios de eventual instabilidade química da substância durante o ensaio,
- todas as informações importantes para a interpretação dos resultados, especialmente no que respeita a impurezas e ao estado físico da substância em estudo.

#### REFERÊNCIAS

- (1) Diretiva 92/69/CEE da Comissão, de 31 de julho de 1992, que adapta ao progresso técnico pela décima sétima vez a Diretiva 67/548/CEE do Conselho relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas (JO L 383 de 29.12.1992, p. 113).
  - (2) NF T 20-045 (AFNOR) (setembro de 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method.
  - (3) NF T 20-046 (AFNOR) (setembro de 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility — Flask method.»
- 2) É aditado o seguinte capítulo A.23:

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

##### INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 123 (2006) da OCDE. O método da agitação lenta permite determinar com exatidão valores de coeficiente de partição 1-octanol/água ( $P_{OW}$ ) até  $\log P_{OW} = 8,2$  (1). É, portanto, um método experimental adequado para a determinação direta do  $P_{OW}$  de substâncias fortemente hidrofóbicas.
2. Outros métodos de determinação do coeficiente de partição 1-octanol/água ( $P_{OW}$ ) são o método dito "do frasco com agitação" (2) e o método de determinação do  $P_{OW}$  com base nos fenómenos de retenção em HPLC de inversão de fases (3). O método do frasco com agitação pode conduzir a resultados anómalos, devido à transferência de microgotículas de octanol para a fase aquosa. À medida que aumenta o valor de  $P_{OW}$ , a presença dessas gotículas na fase aquosa leva a que a concentração da substância em estudo nessa fase seja cada vez mais sobrestimada. A utilização desse método está, portanto, limitada a substâncias com  $P_{OW}$  inferior a 4. O segundo método utiliza valores consistentes de  $P_{OW}$ , determinados diretamente, para calibrar a relação entre os fenómenos de retenção em HPLC e os valores medidos de  $P_{OW}$ . Existia um projeto de orientações da OCDE para a determinação de coeficientes de partição 1-octanol/água de substâncias ionizáveis, que foi abandonado (4).
3. O presente método foi desenvolvido nos Países Baixos. A precisão das metodologias descritas neste método foi validada e otimizada num estudo de validação interlaboratorial em que participaram 15 laboratórios (5).

##### CONSIDERAÇÕES INICIAIS

##### Significado e utilização

4. Foram identificadas relações muito significativas entre o coeficiente de partição 1-octanol/água ( $P_{OW}$ ) de substâncias orgânicas inertes e a bioacumulação dessas substâncias nos peixes. Além disso, demonstrou-se a existência de uma correlação entre o  $P_{OW}$  e a toxicidade para os peixes e entre o  $P_{OW}$  e a sorção dos produtos químicos por meios sólidos, como solos e sedimentos. A referência 6 descreve exaustivamente essas relações.



5. Concluiu-se que existe uma grande variedade de relações entre o coeficiente de partição 1-octanol/água e outras propriedades das substâncias, com importância ao nível da química e toxicologia ambientais. Assim, o coeficiente de partição 1-octanol/água tem vindo a tornar-se um parâmetro fundamental na avaliação do risco ambiental dos produtos químicos e na previsão do destino desses produtos no ambiente.

#### Âmbito de aplicação

6. O método da agitação lenta foi concebido para reduzir a formação de microgotículas de 1-octanol na fase aquosa. Nessas condições, já não se verifica a sobrestimação da concentração na fase aquosa, devida à associação de moléculas da substância em estudo a essas gotículas. O método da agitação lenta é, portanto, particularmente adequado para a determinação do  $P_{OW}$  de substâncias com  $\log P_{OW}$  previsto igual ou superior a 5, caso em que o método do frasco com agitação (2) tende a fornecer resultados erróneos.

#### DEFINIÇÃO E UNIDADES

7. O coeficiente de partição de uma substância entre a água e um solvente lipofílico (1-octanol) caracteriza a distribuição no equilíbrio do produto químico entre as duas fases. O coeficiente de partição entre a água e o 1-octanol ( $P_{OW}$ ) é definido como a razão entre a concentração, no equilíbrio ( $C_O$ ), da substância em estudo em 1-octanol saturado com água e a concentração, no equilíbrio ( $C_W$ ), da substância em estudo em água saturada com 1-octanol.

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Como se trata de um quociente de concentrações, é uma grandeza adimensional. É mais frequentemente apresentado como logaritmo decimal ( $\log P_{OW}$ ). Dado que o  $P_{OW}$  depende da temperatura, os dados apresentados devem mencionar a temperatura das determinações.

#### PRINCÍPIO DO MÉTODO

8. Para a determinação do coeficiente de partição, estabelece-se um equilíbrio entre a água, o 1-octanol e a substância em estudo, a temperatura constante, determinando-se em seguida a concentração da substância em estudo nas duas fases.
9. As dificuldades experimentais ligadas à formação de microgotículas durante o ensaio do frasco com agitação podem ser atenuadas no ensaio de agitação lenta aqui proposto. No ensaio de agitação lenta, estabelece-se um equilíbrio entre a água, o 1-octanol e a substância em estudo, num reator com agitação termostaticado. As transferências de uma fase para a outra são aceleradas pela agitação. Esta provoca um grau de turbulência limitado, que favorece as transferências entre o 1-octanol e a água, sem formação de microgotículas (1).

#### APLICABILIDADE DO ENSAIO

10. Dado que a presença de substâncias diversas da substância em estudo pode influenciar o coeficiente de atividade desta última, a substância em estudo utilizada nos ensaios deve ser pura. Na determinação de coeficientes de partição 1-octanol/água devem ser utilizadas substâncias com o maior grau de pureza disponível no comércio.
11. O presente método aplica-se a substâncias puras que não se dissociem nem associem, nem apresentem atividade interfacial significativa. Pode utilizar-se na determinação do coeficiente de partição 1-octanol/água de substâncias com essas características ou de misturas dessas substâncias. Se o método for utilizado para misturas, os coeficientes de partição 1-octanol/água determinados dependerão da composição química da mistura estudada e da composição eletrolítica da fase aquosa. Desde que seja devidamente complementado, o método também é aplicável a compostos dissociáveis ou associáveis (ver o ponto 12).
12. Devido aos equilíbrios múltiplos que se geram na água e no 1-octanol e influenciam a partição 1-octanol/água das substâncias dissociáveis, como os ácidos orgânicos e os fenóis, as bases orgânicas e as substâncias organometálicas, o coeficiente de partição 1-octanol/água é uma constante fortemente dependente da composição eletrolítica (7)(8). A determinação deste coeficiente exige, portanto, o controlo e registo do pH e da composição eletrolítica durante o ensaio. A avaliação de coeficientes de partição cabe a especialistas. Com base na(s) constante(s) de dissociação, há que selecionar valores de pH adequados, de modo a poder determinar-se um coeficiente de partição para cada estado de ionização. O estudo de compostos organometálicos exige a utilização de tampões não complexantes (8). As condições experimentais devem ser escolhidas tendo em conta os conhecimentos atuais no domínio da química em fase aquosa (constantes de complexação, constantes de dissociação) e de modo a poder prever-se que espécies da substância em estudo estarão presentes nessa fase. A força iónica deverá ser a mesma em todos os ensaios efetuados, utilizando-se para o efeito um eletrólito apropriado.
13. As substâncias com baixa hidrossolubilidade ou  $P_{OW}$  elevado podem dificultar os ensaios, devido ao facto de as concentrações na fase aquosa se tornarem muito baixas e ser difícil a sua determinação rigorosa. Na descrição deste método de ensaio explica-se como ultrapassar o problema.

## INFORMAÇÕES SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

14. Os reagentes químicos devem ser de qualidade analítica ou de grau de pureza superior. Recomenda-se a utilização de substâncias em estudo não marcadas, de composição química conhecida (de preferência, pelo menos 99 % puras), ou marcadas com isótopos radioativos, de composição química e grau de pureza radioquímica conhecidos. No caso de marcadores com período de semidesintegração curto, será necessário efetuar as correções devidas à desintegração. No caso de substâncias em estudo marcadas com isótopos radioativos, deve recorrer-se a um método analítico específico da substância, para garantir que a radioatividade medida esteja diretamente relacionada com a substância em causa.
15. Pode estimar-se o  $\log P_{OW}$  utilizando *software* disponível no mercado para esse efeito, ou com base na razão entre a solubilidade em cada um dos solventes.
16. Antes de se proceder a um ensaio de agitação lenta para determinação de um  $P_{OW}$ , deve dispor-se das seguintes informações sobre a substância em estudo:
  - a) fórmula estrutural;
  - b) métodos analíticos adequados para determinar a concentração da substância em água e em 1-octanol;
  - c) constante(s) de dissociação, no caso das substâncias ionizáveis (Orientações n.º 112 da OCDE) (9);
  - d) hidrossolubilidade (10);
  - e) hidrólise abiótica (11);
  - f) biodegradabilidade "fácil" (12);
  - g) pressão de vapor (13).

## DESCRIÇÃO DO MÉTODO

**Material e aparelhagem**

17. É necessário o material de laboratório de uso corrente, nomeadamente o seguinte:
  - agitadores magnéticos e barras magnéticas revestidas de Teflon, para agitar a fase aquosa,
  - aparelhagem analítica adequada para determinar as concentrações esperadas da substância em estudo,
  - recipiente de agitação com uma torneira no fundo. Em função do  $\log P_{OW}$  previsto e do limite de deteção (LOD) do composto em estudo, ponderar-se-á a utilização de um recipiente de reação com a mesma geometria e volume superior a um litro, para se obter um volume de água suficiente para a extração e a análise químicas. Este procedimento permitirá obter concentrações mais elevadas no extrato aquoso e possibilitará, portanto, uma determinação analítica mais fiável. Figura no apêndice 1 um quadro de estimativas do volume mínimo necessário, em função do LOD, do  $\log P_{OW}$  estimado e da hidrossolubilidade do composto. O quadro tem por base a relação entre o  $\log P_{OW}$  e a razão das solubilidades em octanol e em água, segundo Pinsuwan *et al.* (14):

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

em que:

$$SR = S_{\text{octanol}}/S_{\text{água}} \text{ (em molaridade),}$$

bem como a relação apresentada por Lyman (15) para estimativas de hidrossolubilidade. As hidrossolubilidades calculadas através da equação do apêndice 1 devem considerar-se uma primeira estimativa. Note-se que o utilizador é livre de efetuar estimativas da hidrossolubilidade por meio de qualquer correspondência que se considere representar melhor a relação entre a hidrofobicidade e a solubilidade. Por exemplo, no caso dos compostos sólidos, recomenda-se que o ponto de fusão seja tido em conta nas previsões de solubilidade. Se for utilizada uma equação modificada, deve garantir-se a validade da equação utilizada para o cálculo da solubilidade em octanol. A figura do apêndice 2 esquematiza um recipiente de agitação, com camisa de vidro, com cerca de um litro de capacidade. As proporções do recipiente ilustrado no apêndice 2 revelaram-se favoráveis e, se forem utilizados recipientes de volume diferente, devem ser mantidas;

- um meio de manter a temperatura constante (aspeto essencial) durante o ensaio com agitação lenta.

18. Os recipientes devem ser de um material inerte, para que a adsorção à sua superfície seja insignificante.

#### Preparação das soluções a utilizar nos ensaios

19. A determinação do  $P_{OW}$  deve ser efetuada com 1-octanol do grau de pureza mais elevado disponível no mercado (grau de pureza mínimo de 99 %). Recomenda-se a purificação do 1-octanol por extração ácida, básica e com água, seguida de secagem. Também pode purificar-se o 1-octanol por destilação. Na preparação das soluções-padrão da substância em estudo deve utilizar-se 1-octanol purificado. A água a utilizar na determinação do  $P_{OW}$  deve ser destilada em material de vidro ou de quartzo ou ser proveniente de um sistema de purificação ou ser própria para HPLC. A água destilada deve ser filtrada através de um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  e devem ser previstos ensaios em branco, para verificar se os extratos concentrados contêm impurezas que possam interferir com a substância em estudo. Caso se utilize um filtro de fibra de vidro, este deve ser limpo por aquecimento em estufa, durante pelo menos três horas, a 400 °C.
20. Antes do ensaio, os solventes são mutuamente saturados e levados ao equilíbrio num recipiente suficientemente grande. Para o efeito, o sistema constituído pelas duas fases é mantido sob agitação durante dois dias.
21. Toma-se e dissolve-se em 1-octanol (saturado com água) um volume apropriado, à concentração requerida, da substância em estudo. O coeficiente de partição 1-octanol/água tem de ser determinado em soluções diluídas em 1-octanol e em água. A concentração da substância em estudo não deve, portanto, exceder 70 % da solubilidade desta, sendo 0,1 M a concentração máxima em cada fase (1). As soluções de 1-octanol utilizadas no ensaio não podem conter partículas sólidas, em suspensão, da substância em estudo.
22. Dissolve-se em 1-octanol (saturado com água) uma quantidade apropriada da substância em estudo. Se for previsto um  $\log P_{OW}$  superior a cinco, as soluções de 1-octanol utilizadas no ensaio não devem conter partículas sólidas, em suspensão, da substância em estudo. Para o efeito, proceder-se-á do seguinte modo, no caso dos produtos químicos com  $\log P_{OW}$  superior a 5:
- dissolve-se a substância em estudo em 1-octanol (saturado com água),
  - deixa-se a solução em repouso durante um período suficiente para que a substância sólida em suspensão deposite. Durante a decantação, mede-se continuamente a concentração da substância em estudo,
  - depois de as concentrações medidas na solução de 1-octanol terem estabilizado, dilui-se a solução de reserva com um volume apropriado de 1-octanol,
  - determina-se a concentração da solução de reserva diluída. Se a concentração determinada for coerente com a diluição, pode utilizar-se a solução de reserva diluída no ensaio de agitação lenta.

#### Extração e análise das amostras

23. Na determinação da substância em estudo deve utilizar-se um método analítico validado. Os investigadores terão de demonstrar que, durante o ensaio, as concentrações na fase de 1-octanol saturado em água e na fase aquosa saturada em 1-octanol são superiores ao limite de quantificação do método analítico utilizado. Se houver que recorrer a métodos de extração, será necessário determinar as recuperações analíticas da substância em estudo da fase aquosa e da fase de 1-octanol. O sinal analítico deve ser corrigido em função dos brancos e devem tomar-se as precauções necessárias para não haver transferências da substância em análise entre amostras.
24. Antes da análise, e em caso de concentrações baixas de substâncias em estudo hidrofóbicas na fase aquosa, é provável que seja necessário extrair a fase aquosa com um solvente orgânico e preconcentrar o extrato. Pela mesma razão, é necessário reduzir as concentrações finais nos brancos. Para o efeito, há que utilizar solventes de elevada pureza, de preferência solventes para análise de resíduos. Por outro lado, a utilização de material de vidro cuidadosamente limpo (por lavagem com solventes ou aquecimento a alta temperatura) pode ajudar a evitar contaminações cruzadas.
25. Para estimar o valor de  $\log P_{OW}$ , pode utilizar-se um programa de estimativas ou recorrer-se a uma avaliação especializada. Se o valor for superior a 6, terá de se prestar muita atenção às correções em função dos brancos e às transferências da substância em análise. Além disso, se a estimativa de  $\log P_{OW}$  for superior a 6, é obrigatório utilizar um padrão paralelo para corrigir a taxa de recuperação, de modo a obterem-se fatores de preconcentração elevados. Existem no mercado vários programas de *software* que fornecem estimativas de  $\log P_{OW}$ , nomeadamente o Clog P (16), o KOWWIN (17), o ProLogP (18) e o ACD log P (19) (1). As referências 20 a 22 descrevem os métodos de estimativa.

(1) Esta informação é prestada apenas a título indicativo. Podem ser utilizados programas informáticos equivalentes, desde que permitam obter resultados comprovadamente idênticos.

26. Os limites de quantificação (LOQ) da substância em estudo em 1-octanol e em água determinam-se por métodos bem estabelecidos. Como regra prática, o limite de quantificação de um método corresponde à concentração em água ou em 1-octanol que gera um sinal dez vezes mais intenso que o ruído. Há que escolher um método adequado de extração e de preconcentração e também que especificar as recuperações analíticas. Deve selecionar-se um fator de preconcentração adequado, que permita obter sinais da intensidade requerida na determinação analítica.
27. Com base nos parâmetros do método analítico e nas concentrações esperadas, define-se um tamanho de amostra aproximado para a determinação rigorosa da concentração do composto em causa. Para se obterem sinais analíticos suficientes, deve evitar-se a utilização de amostras aquosas demasiado pequenas. Também deve evitar-se utilizar amostras aquosas demasiado grandes; caso contrário, a água disponível pode não ser suficiente para o número mínimo de análises exigido ( $n = 5$ ). No apêndice 1, apresenta-se o volume mínimo de amostra em função do volume do recipiente, do LOD da substância em estudo e da solubilidade desta última.
28. A quantificação das substâncias em estudo efetua-se por comparação com curvas de calibração do composto em causa. As concentrações nas amostras analisadas devem estar compreendidas entre concentrações de padrões.
29. No caso das substâncias cuja estimativa de  $\log P_{OW}$  seja superior a 6, há que adicionar um padrão paralelo à amostra aquosa antes da extração, para contabilizar as perdas ocorridas durante a extração e a preconcentração de amostras aquosas. Para possibilitar uma correção rigorosa da taxa de recuperação, os padrões paralelos devem ter propriedades muito próximas ou idênticas às da substância em estudo. De preferência, são utilizados análogos das substâncias em causa marcados com isótopos estáveis (por exemplo, análogos perdeuterados ou marcados com  $^{13}C$ ). Se não for possível utilizar isótopos marcadores estáveis ( $^{13}C$  ou  $^2H$ ), haverá que demonstrar, com base em dados fiáveis recolhidos na literatura científica, que as propriedades físico-químicas do padrão paralelo são muito próximas das propriedades da substância em estudo. Durante a extração líquido-líquido da fase aquosa, podem formar-se emulsões. Estas podem reduzir-se por adição de sal ou deixando-as decantar de um dia para o outro. Os métodos utilizados para extrair e preconcentrar as amostras devem ser indicados nos relatórios.
30. Antes de serem analisadas, as amostras tomadas da fase de 1-octanol podem, se necessário, diluir-se com um solvente adequado. Além disso, no caso das substâncias cujos ensaios de recuperação revelem grandes variações nos mesmos (desvio-padrão relativo superior a 10 %), recomenda-se a utilização de padrões paralelos, para corrigir as taxas de recuperação.
31. Os relatórios devem incluir uma descrição do método analítico que incida na técnica de extração, nos fatores de preconcentração e de diluição, nos parâmetros instrumentais, nas rotinas e no intervalo de calibração, na recuperação analítica da substância em estudo da fase aquosa, na adição de padrões paralelos para corrigir as taxas de recuperação, nos valores dos brancos e nos limites de deteção e de quantificação.

#### **Realização do ensaio**

##### *Razões volumétricas 1-octanol/água ótimas*

32. Ao escolher os volumes de água e de 1-octanol deve ter-se em conta o seguinte: o limite de quantificação em 1-octanol e em água, os fatores de preconcentração aplicados às amostras de água, os volumes das amostras de 1-octanol e de água colhidas e as concentrações previstas. Por razões experimentais, o volume de 1-octanol no sistema em agitação lenta deve ser escolhido de forma a obter-se uma fase de 1-octanol suficientemente espessa (mais de 0,5 cm), para que seja possível colher amostras dessa fase sem a perturbar.
33. Na determinação de compostos com  $\log P_{OW}$  igual ou superior a 4,5, a relação entre os volumes de cada fase habitualmente utilizados é de 20 ml a 50 ml de 1-octanol para 950 ml a 980 ml de água, num recipiente de um litro.

##### *Condições de realização do ensaio*

34. O recipiente de reação deve manter-se termostaticado durante o ensaio, de modo que as variações de temperatura sejam inferiores a 1 °C. O ensaio deve ser efetuado a 25 °C.
35. Deve proteger-se o dispositivo experimental da luz solar, efetuando o ensaio em câmara escura ou cobrindo o recipiente de reação com folha de alumínio.
36. Deve efetuar-se o ensaio num ambiente tão isento de poeiras quanto possível.
37. Agita-se o sistema 1-octanol/água até se atingir o equilíbrio. O período necessário é determinado num ensaio-piloto com agitação lenta, recolhendo-se regularmente amostras de água e de 1-octanol. O intervalo mínimo entre a colheita de amostras consecutivas é de cinco horas.
38. A determinação de um  $P_{OW}$  deve basear-se em, pelo menos, três ensaios com agitação lenta independentes.

*Determinação do tempo necessário para atingir o equilíbrio*

39. Considera-se que se atingiu o equilíbrio quando o gráfico da razão de concentrações 1-octanol/água em função do tempo, num período que abranja 4 momentos de colheita de amostras, se caracterizar por um declive não significativamente diferente de zero, para  $p = 0,05$  (limite de confiança de 95 %). Deve atingir-se o equilíbrio pelo menos um dia antes de se iniciar a colheita de amostras. Como regra prática, a colheita de amostras de substâncias cuja estimativa de  $\log P_{OW}$  seja inferior a 5 pode ter lugar ao segundo e ao terceiro dias. Caso se trate de substâncias particularmente hidrofóbicas, o período necessário para se atingir o equilíbrio pode ter de ser alargado. No caso de um composto com  $\log P_{OW}$  de 8,23 (decaclorobifenilo), bastaram 144 horas para se atingir o equilíbrio. As amostras para determinação do estado de equilíbrio colhem-se num único recipiente.

*Início do ensaio*

40. No início do ensaio, enche-se o recipiente de reação com água saturada de 1-octanol. Deve esperar-se tempo suficiente para atingir a temperatura termostalizada.
41. Adiciona-se cuidadosamente ao recipiente de reação a quantidade pretendida da substância em estudo dissolvida no volume requerido de 1-octanol saturado com água. Esta etapa é crucial no ensaio, havendo que evitar uma mistura turbulenta das duas fases. Para o efeito, pode pipetar-se lentamente o 1-octanol contra a parede do recipiente, junto à superfície da água, de modo que escorra ao longo da parede de vidro e forme um filme por cima da fase aquosa. É totalmente de excluir que o 1-octanol seja simplesmente vertido para o recipiente. É igualmente de excluir que se deixem cair gotas de 1-octanol diretamente na água.
42. Depois de iniciada a agitação, deve aumentar-se gradualmente a velocidade desta. Se o motor de agitação não puder ser convenientemente regulado, deve ponderar-se a utilização de um transformador. Importa regular a velocidade de agitação de modo a formar-se um vórtice de profundidade compreendida entre 0,5 cm e 2,5 cm na interface entre a água e o 1-octanol. Se a profundidade do vórtice exceder 2,5 cm, deve reduzir-se a velocidade de agitação; caso contrário, poderão formar-se microgotículas na fase aquosa, a partir das gotas de 1-octanol geradas, com a conseqüente sobrestimação da concentração da substância em estudo na água. A velocidade de agitação que gera o vórtice máximo de 2,5 cm é recomendada com base nas conclusões de um estudo de validação interlaboratorial (5). Constitui um compromisso entre a rapidez com que se atinge o equilíbrio e a limitação da formação de microgotículas de 1-octanol.

*Colheita e tratamento das amostras*

43. Antes da colheita das amostras, deve desligar-se o agitador e esperar-se que os líquidos se imobilizem. Depois de colhidas as amostras, volta a pôr-se o agitador lentamente em movimento, conforme descrito acima, aumentando-se gradualmente a velocidade de agitação.
44. Colhem-se as amostras da fase aquosa à saída da torneira existente no fundo do recipiente de reação. Rejeitar sempre o volume morto de água retido na torneira (cerca de 5 ml no recipiente ilustrado no apêndice 2); a água retida na torneira não é agitada e, portanto, não se encontra em equilíbrio com o resto do líquido. Registar o volume das amostras de água e não esquecer que a quantidade de substância em estudo presente na água rejeitada deve ser tida em conta no balanço de massas. Para minimizar as perdas por evaporação, deve verter-se cuidadosamente a água na ampola de decantação, de modo a não perturbar a interface água/1-octanol.
45. Constituem-se amostras de 1-octanol retirando uma pequena alíquota (cerca de 100  $\mu$ l) da fase de 1-octanol, com uma seringa de vidro e metal de 100 microlitros. Devem tomar-se as precauções necessárias para não perturbar a interface. Registar o volume das amostras. É suficiente uma alíquota de pequeno volume, pois a amostra de 1-octanol vai ser diluída.
46. Devem evitar-se transferências desnecessárias das amostras. Para isso, deve determinar-se gravimetricamente o volume das amostras. No caso das amostras de água, poderá recolher-se cada amostra numa ampola de decantação que contenha já o volume de solvente necessário.

**DADOS E RELATÓRIOS**

47. Este método de ensaio prevê a determinação do coeficiente de partição 1-octanol/água ( $P_{OW}$ ) com base em três ensaios com agitação lenta (três unidades experimentais), em condições idênticas, do composto em estudo. A correspondência utilizada para demonstrar que o equilíbrio foi atingido deve basear-se nos resultados de, pelo menos, quatro determinações de  $C_O/C_W$  em momentos consecutivos de colheita de amostras. Pode, assim, calcular-se a variância, como medida da incerteza do valor médio obtido em cada unidade experimental.
48. Pode caracterizar-se o valor de  $P_{OW}$  pela variância dos resultados obtidos em cada unidade experimental. Utiliza-se esta informação para calcular o  $P_{OW}$  como média ponderada dos resultados obtidos em cada uma das unidades. Para isso, utiliza-se como fator de ponderação o inverso da variância dos resultados de cada unidade experimental. Consequentemente, os dados com maior variação (expressa pela variância) e, portanto, menos fiáveis têm menos influência no resultado final do que os dados com menor variância.

49. Calcula-se também, de modo análogo, um desvio-padrão ponderado. Este parâmetro caracteriza a repetibilidade da medição do  $P_{OW}$ . Um valor baixo de desvio-padrão ponderado indica uma repetibilidade elevada da determinação de  $P_{OW}$  num laboratório. Resume-se a seguir o tratamento estatístico formal dos dados.

#### Tratamento dos resultados

##### *Demonstração de que se atingiu o equilíbrio*

50. Calcula-se, para cada momento de colheita de amostras, o logaritmo da razão entre a concentração da substância em estudo em 1-octanol e em água [ $\log (C_O/C_W)$ ]. Comprova-se se o equilíbrio foi atingido representado graficamente essa razão em função do tempo. Se, nessa representação, for definido um patamar que abranja pelo menos quatro momentos consecutivos de colheita de amostras, o equilíbrio terá sido atingido e o composto estará verdadeiramente dissolvido no 1-octanol. Caso contrário, será necessário prosseguir o ensaio, até que quatro pontos consecutivos de colheita de amostras gerem um declive não significativamente diferente de zero, para  $p = 0,05$ , indicando assim que o parâmetro  $\log (C_O/C_W)$  é independente do tempo.

##### *Cálculo de $\log P_{OW}$*

51. O valor de  $\log P_{OW}$  de cada unidade experimental corresponde ao valor médio ponderado de  $\log (C_O/C_W)$  referente à parte da curva de  $\log (C_O/C_W)$  em função do tempo na qual o equilíbrio foi comprovadamente atingido. Calcula-se essa média ponderando os dados com o inverso da variância, de modo que a influência dos dados no resultado final seja inversamente proporcional à incerteza dos mesmos.

##### *Valor médio de $\log P_{OW}$*

52. O valor médio do  $\log P_{OW}$  de várias unidades experimentais corresponde à média dos resultados dessas unidades, ponderados com a variância da unidade respetiva.

O cálculo a efetuar é o seguinte:

$$\log P_{OW,Av} = (\sum w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\sum w_i)^{-1}$$

em que:

$\log P_{OW,i}$  = valor do  $\log P_{OW}$  da unidade experimental  $i$ ;

$\log P_{OW,Av}$  = valor médio ponderado das determinações de  $\log P_{OW}$ ;

$w_i$  = ponderação estatística do valor de  $\log P_{OW}$  correspondente à unidade experimental  $i$ .

Como  $w_i$  utiliza-se o inverso da variância de  $\log P_{OW,i}$  [ $w_i = (\text{var } \log P_{OW,i})^{-1}$ ].

53. Como estimativa do erro do valor médio de  $\log P_{OW}$  utiliza-se a repetibilidade do  $\log (C_O/C_W)$  determinado para a fase de equilíbrio de cada unidade experimental. Exprime-se esse erro como o desvio-padrão ponderado de  $\log P_{OW,Av}$  ( $\sigma_{\log P_{OW,Av}}$ ), o qual mede o erro associado a  $\log P_{OW,Av}$ . O desvio-padrão ponderado pode calcular-se do seguinte modo, a partir da variância ponderada

$$\text{var}_{\log P_{OW,Av}} = (\sum w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\sum w_i \times (n - 1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log P_{OW,Av}} = (\text{var}_{\log P_{OW,Av}})^{0,5}$$

O símbolo "n" corresponde ao número de unidades experimentais.

#### Relatório dos ensaios

54. Elementos a constar do relatório dos ensaios:

##### *Substância em estudo:*

- nome comum, denominação química, número CAS, fórmula estrutural (indicando a posição marcada marcada com isótopos radioativos, se for esse o caso) e propriedades físico-químicas pertinentes (ver o ponto 17),
- grau de pureza da substância (presença de impurezas),
- grau de pureza radioquímica da substância marcada e atividade molar (se for caso disso),
- estimativa preliminar de  $\log P_{OW}$  e método de cálculo utilizado para determinar esse valor.

*Condições de realização do ensaio:*

- datas da realização dos estudos,
- temperatura durante os ensaios,
- volumes de 1-octanol e de água no início de cada ensaio,
- volumes das amostras de 1-octanol e de água colhidas,
- volumes de 1-octanol e de água que permanecem nos recipientes de ensaio,
- descrição dos recipientes de ensaio e das condições de agitação utilizados (geometria da barra de agitação e do recipiente de ensaio, altura do vórtice, em milímetros, e, quando conhecida, velocidade de agitação),
- métodos de análise utilizados para determinar a substância em estudo e limite de quantificação dos mesmos,
- cronologia das colheitas de amostras,
- pH da fase aquosa e tampões utilizados, quando se regula o pH devido à presença de moléculas ionizáveis,
- número de replicados.

*Resultados:*

- repetibilidade e sensibilidade dos métodos de análise utilizados,
- concentrações determinadas da substância em estudo no 1-octanol e na água, em função do tempo,
- balanço de massas,
- temperatura e desvio-padrão da temperatura, ou intervalo de temperaturas, durante o ensaio,
- gráfico da razão das concentrações em função do tempo,
- valor médio  $\log P_{OW,Av}$  e erro-padrão do mesmo,
- discussão e interpretação dos resultados,
- exemplos de dados não tratados de análises representativas (os dados não tratados devem ser todos registados de acordo com as boas práticas de laboratório), incluindo recuperações de padrões paralelos, número de níveis de concentração utilizado na calibração (juntamente com os critérios do coeficiente de correlação da curva de calibração) e resultados de controlo/garantia de qualidade,
- caso exista: relatório da validação do protocolo experimental (a mencionar nas referências).

*REFERÊNCIAS:*

- (1) De Bruijn J.H.M., Busser F., Seinen W., Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the "slow-stirring" method. *Environ. Toxicol. Chem.* 8:499-512.
- (2) Capítulo A.8 deste anexo, "Coeficiente de partição".
- (3) Capítulo A.8 deste anexo, "Coeficiente de partição".
- (4) OCDE (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122, Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.
- (5) Tolls J. (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.
- (6) Boethling R.S., Mackay D. (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.

- (7) Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M. (1993). *Environmental Organic Chemistry*. Wiley, New York, NY.
  - (8) Arnold C.G., Widenhaupt A., David M.M., Müller S.R., Haderlein S.B., Schwarzenbach R.P. (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31:2596-2602.
  - (9) OCDE (1981). *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112, Dissociation Constants in Water*. Paris.
  - (10) Capítulo A.6 deste anexo, "Solubilidade em água".
  - (11) Capítulo C.7 deste anexo, "Degradação – Degradação abiótica: Hidrólise em função do pH".
  - (12) Capítulo C.4, "Determinação da biodegradabilidade 'Fácil'", partes II a VII (métodos A a F), deste anexo.
  - (13) Capítulo A.4 deste anexo, "Pressão de vapor".
  - (14) Pinsuwan S., Li A., Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients. *J. Chem. Eng. Data* 40:623-626.
  - (15) Lyman W.J. (1990). Solubility in water. In: *Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds*. Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H. Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 a 2-52.
  - (16) Leo A., Weininger D. (1989). *Medchem Software Manual*. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.
  - (17) Meylan W. (1993). *SRC-LOGKOW for Windows*. SRC, Syracuse, N.Y.
  - (18) Compudrug L. (1992). *ProLogP*. Compudrug, Ltd., Budapest.
  - (19) ACD. *ACD logP*. Advanced Chemistry Development, Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.
  - (20) Lyman W.J. (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., eds., *Handbook of chemical property estimation*. American Chemical Society, Washington, D.C.
  - (21) Rekker R.F., de Kort H.M. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14:479-488.
  - (22) Jübermann O. (1958). Houben-Weyl, ed., *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.
-



## Apêndice 1

**Tabela para o cálculo do volume mínimo de água necessário para a deteção, em fases aquosas, de substâncias em estudo com diferentes valores de log P<sub>OW</sub>**

Pressupostos:

- Volume máximo de cada alíquota = 10 % do volume total; 5 alíquotas = 50 % do volume total.
- Concentração da substância em estudo = 0,7 × solubilidade em cada fase. Se a concentração for mais baixa, serão necessários volumes maiores.
- Volume utilizado para determinar o limite de deteção (LOD) = 100 ml.
- As relações log P<sub>OW</sub> em função de log S<sub>W</sub> e log P<sub>OW</sub> em função de SR (solubilidade relativa, S<sub>O</sub>/S<sub>W</sub>) traduzem com razoabilidade relações evidenciadas pelas substâncias às quais o método se aplica.

Estimativa de S<sub>W</sub>

log P <sub>OW</sub>	Equação	log S <sub>W</sub>	S <sub>W</sub> (mg/l)
4	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	0,035	1,084E+00
5	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	-0,426	3,750E-01
5,5	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	-0,887	1,297E-01
6	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	-1,348	4,487E-02
6,5	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	-1,809	1,552E-02
7	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	-2,270	5,370E-03
7,5	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	-2,731	1,858E-03
8	$(-0,922 \times \log P_{OW} + 4,184)$	-3,192	6,427E-04

Estimativa de S<sub>O</sub>

log P <sub>OW</sub>	Equação	S <sub>O</sub> (mg/l)
4	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,49$	2,710E+05

Massa total da substância em estudo (mg)	Massa <sub>octanol</sub> /Massa <sub>água</sub>	Massa <sub>água</sub> (mg)	Concentração <sub>água</sub> (mg/l)	Massa <sub>octanol</sub> (mg)	Concentração <sub>octanol</sub> (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333

Massa total da substância em estudo (mg)	Massa <sub>octanol</sub> /Massa <sub>água</sub>	Massa <sub>água</sub> (mg)	Concentração <sub>água</sub> (mg/l)	Massa <sub>octanol</sub> (mg)	Concentração <sub>octanol</sub> (mg/l)
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

*Cálculo dos volumes***Volume mínimo da fase aquosa, em função do limite de deteção (LOD)**

log K <sub>OW</sub>	LOD (microgramas/l) →	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volume utilizado na determinação do LOD (l)	0,1					

*Legenda*

Representa menos de 10 % do volume total de fase aquosa, com um recipiente de equilíbrio de um litro.

Representa menos de 10 % do volume total de fase aquosa, com um recipiente de equilíbrio de dois litros.

Representa menos de 10 % do volume total de fase aquosa, com um recipiente de equilíbrio de cinco litros.

Representa menos de 10 % do volume total de fase aquosa, com um recipiente de equilíbrio de 10 litros.

Excede 10 % do volume até do recipiente de equilíbrio de 10 litros.

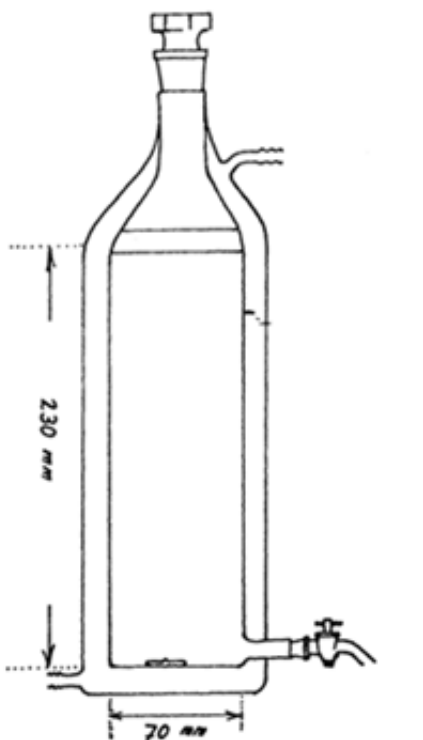
**Resumo dos volumes necessários, em função da hidrossolubilidade e do log P<sub>OW</sub>**

Volume mínimo (ml) da fase aquosa, em função do limite de deteção (LOD)

log P <sub>OW</sub>	S <sub>w</sub> (mg/l)	LOD (microgramas/l) →	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86

log P <sub>ow</sub>	S <sub>w</sub> (mg/l)	LOD (microgramas/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volume utilizado na determinação do LOD (l)		0,1					

## Apêndice 2

Exemplo de recipiente com camisa de vidro para o ensaio com agitação lenta, para determinação do  $P_{OW}$ 

3) O capítulo B.2 passa a ter a seguinte redação:

## «B.2. TOXICIDADE AGUDA POR INALAÇÃO

## INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline 403* (2009) da OCDE (1). O *Test Guideline 403* (TG 403) inicial relativo à toxicidade aguda por inalação foi adotado em 1981. Este método B.2 revisto (equivalente à versão revista do *Test Guideline 403*) visa maior flexibilidade, reduzir a utilização de animais e responder às exigências da regulamentação. Compreende dois tipos de estudos: um protocolo tradicional para determinação da  $CL_{50}$  e um protocolo de concentração em função do tempo ( $C \times t$ ). As principais características deste método são a capacidade de estabelecer uma relação de resposta à concentração na gama letal e não letal, tendo em vista o cálculo da mediana da concentração letal ( $CL_{50}$ ), do limiar da concentração não letal (por exemplo,  $CL_{01}$ ) e do declive, bem como a capacidade de determinar se algum dos sexos tem maior sensibilidade. Deve recorrer-se ao protocolo  $C \times t$  quando a regulamentação aplicável ou critérios científicos exigem o ensaio em animais durante vários períodos, nomeadamente para efeitos de planeamento da resposta a situações de emergência – por exemplo, para determinação de níveis-guia de exposição aguda (AEGL), estabelecimento de orientações destinadas ao planeamento da resposta a situações de emergência ou cálculo de limiares de exposição aguda – ou de ordenamento do território.
2. O *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing* (GD 39) (2) contém orientações para a realização e interpretação dos estudos previstos neste método de ensaio.
3. No final do capítulo e no referido GD 39 (2) são definidos alguns conceitos utilizados neste método.
4. Este método permite caracterizar produtos químicos, avaliar quantitativamente os riscos correspondentes e escaloná-los e classificá-los de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (3). O documento GD 39 (2) fornece orientações para a escolha do método adequado para o ensaio de efeitos agudos. Quando apenas são necessárias informações relativas à classificação e à rotulagem, o método normalmente recomendado é o do capítulo B.52 (4) deste anexo [ver o GD 39 (2)]. O método B.2 não se destina especificamente ao ensaio de materiais especiais, tais como matérias fibrosas ou isométricas pouco solúveis ou nanomateriais manufacturados.

#### CONSIDERAÇÕES INICIAIS

5. Antes de proceder a ensaios segundo este método, o laboratório deve ter em conta os elementos disponíveis sobre o produto químico, nomeadamente estudos já efetuados [por exemplo, com base no capítulo B.52 (4) deste anexo] cujos resultados eventualmente dispensem a realização de mais ensaios, a fim de minimizar a utilização de animais. Entre os elementos úteis para a escolha da espécie, da estirpe, do sexo, do modo de exposição e das concentrações mais adequados contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, resultados de ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana e dados (Q)SAR – "(quantitative) structure-activity relationships", relações (quantitativas) estrutura/atividade – e toxicológicos disponíveis sobre substâncias estruturalmente afins [ver o GD 39 (2)].
6. Deve evitar-se o mais possível ensaiar produtos químicos corrosivos e/ou irritantes a concentrações que presumivelmente causarão dor e/ou sofrimento intensos. Para determinar se é possível renunciar a mais ensaios, deve avaliar-se o potencial corrosivo/irritante segundo critérios de especialistas na matéria, designadamente com base em elementos relativos a experiências em pessoas ou animais (por exemplo, provenientes de estudos de dose repetida realizados a concentrações não corrosivas/não irritantes), em dados *in vitro* [por exemplo, provenientes da aplicação dos métodos descritos nos capítulos B.40 (5) ou B.40.A (6) deste anexo ou do *Test Guideline 435* da OCDE (7)], em valores de pH, em informações relativas a substâncias similares ou noutros dados pertinentes. Para determinadas necessidades impostas pela regulamentação (por exemplo, fins de planeamento para situações de emergência), pode recorrer-se a este método para expor animais a matérias com essas características, pois o método permite ao diretor ou ao investigador principal do estudo gerir a escolha das concentrações visadas. Estas não devem induzir irritação/corrosão acentuada, mas devem ser suficientes para que a curva de resposta à concentração abranja os níveis correspondentes aos objetivos do ensaio, nos planos científico e da regulamentação. É necessário justificar as concentrações escolhidas em cada caso [ver o GD 39 (2)].

#### PRINCÍPIO DO MÉTODO

7. O método B.2 revisto visa obter informações suficientes sobre a toxicidade aguda de produtos químicos, a fim de permitir classificá-los e de obter os dados de letalidade (por exemplo,  $CL_{50}$ ,  $CL_{01}$  e declive) para um ou ambos os sexos necessários à avaliação quantitativa dos riscos. O método contempla duas possibilidades. A primeira é um protocolo tradicional, no qual se expõem grupos de animais a uma concentração-limite (ensaio do limite) ou a uma série de concentrações gradualmente mais elevadas durante um período predeterminado, normalmente quatro horas. Por razões ligadas à regulamentação aplicável, a duração da exposição pode ser diferente. A segunda possibilidade é um protocolo  $C \times t$ , no qual se expõem grupos de animais a uma só concentração (concentração-limite), ou a uma série de concentrações, durante períodos variáveis.
8. Os animais moribundos ou que apresentem sinais óbvios de dor ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados e, na interpretação dos resultados do ensaio, ser considerados do mesmo modo que os animais que morrem no ensaio. O documento de orientações n.º 19 da OCDE, relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (8), define os critérios que devem presidir à decisão de eutanasiar animais moribundos ou em grande sofrimento, bem como orientações sobre o reconhecimento da morte previsível ou iminente.

#### DESCRIÇÃO DO MÉTODO

##### Escolha da espécie animal

9. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. A espécie preferida é o rato. É necessário justificar a utilização de outras espécies.

##### Preparação dos animais

10. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas. No dia da exposição, os animais devem ser adultos jovens com oito a 12 semanas, de peso corporal não desviado mais de 20 % do peso médio correspondente a cada sexo dos animais da mesma idade anteriormente expostos. Os animais devem ser selecionados aleatoriamente e marcados para identificação individual. Para aclimação às condições laboratoriais, devem permanecer nas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início do ensaio. Durante um curto período antes do ensaio, também devem ser aclimatados ao dispositivo de ensaio, para diminuir a tensão causada por um ambiente novo.

##### Manutenção dos animais

11. A temperatura do biotério deve ser de  $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ . O ideal será manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, embora isto possa não ser possível ao utilizar água como veículo. Antes e depois das exposições, os animais são geralmente engaiolados por sexo e por concentração, mas o número de animais por gaiola não deve dificultar a clara observação de cada animal e deve minimizar as perdas devidas a lutas ou canibalismo. Quando se opta pela exposição unicamente nasal dos animais, pode ser necessário aclimatá-los aos tubos de contenção. Estes não devem provocar aos animais tensões físicas, térmicas ou dinâmicas excessivas. A contenção dos animais pode afetar parâmetros fisiológicos como a temperatura corporal (hipertermia) e/ou o volume respirado por minuto. Caso se disponha de dados genéricos reveladores de que nenhuma destas alterações ocorre em grau apreciável, não será necessária a preadaptação aos tubos de contenção. Os animais cujo corpo seja exposto na totalidade a um aerossol devem permanecer em gaiolas individuais durante a exposição, para evitar que o aerossol seja

filtrado pela pelagem dos que com eles coabitam. Exceto nos períodos de exposição, podem utilizar-se dietas convencionais certificadas de laboratório, com fornecimento ilimitado de água potável da rede pública. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão.

#### **Câmaras de inalação**

12. Ao escolher-se a câmara de inalação, deve ter-se em conta a natureza do produto químico em estudo e o objetivo do ensaio. Privilegia-se o modo de exposição unicamente nasal, termo que abrange as exposições "unicamente da cabeça", "unicamente do nariz" e "unicamente do focinho". A exposição unicamente nasal é geralmente preferida no estudo de aerossóis de líquidos ou de sólidos, ou de vapores que possam condensar-se e formar aerossóis. Para determinados objetivos do estudo, poderá ser melhor recorrer ao modo de exposição do corpo inteiro, mas será necessário justificá-lo no relatório. Para garantir estabilidade atmosférica nas câmaras de corpo inteiro, o volume de todos os animais presentes em cada câmara não deve exceder 5 % do volume da câmara. O documento GD 39 (2) descreve os princípios, vantagens e desvantagens das técnicas de exposição unicamente nasal e do corpo inteiro.

#### **CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO**

##### **Administração das concentrações**

13. As exposições unicamente nasais de ratos podem durar até seis horas. As exposições unicamente nasais de ratinhos geralmente não vão além de quatro horas. Caso sejam necessários estudos mais longos, é necessário justificá-lo [ver o GD 39 (2)]. Os animais expostos a aerossóis em câmaras de corpo inteiro devem ser alojados individualmente, para evitar que animais coabitantes ingiram o produto químico em estudo ao lambem-se uns aos outros. Durante o período de exposição, a alimentação deve ser suspensa. Durante as exposições do corpo inteiro pode continuar a fornecer-se água.
14. Os animais são expostos ao produto químico em estudo sob a forma de gás, vapor, aerossol ou de uma mistura destes. O estado físico a ensaiar depende das propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, da concentração escolhida e/ou da forma física cuja probabilidade de presença durante a manipulação e utilização do mesmo seja maior. Os produtos químicos higroscópicos ou quimicamente reativos devem ser ensaiados em atmosfera seca. Devem tomar-se precauções para evitar concentrações que possam provocar explosões.

##### **Distribuição granulométrica**

15. Os aerossóis e os vapores que possam condensar-se em aerossóis devem ser objeto de análise granulométrica. Para que todas as zonas pertinentes do aparelho respiratório sejam expostas, recomenda-se a utilização de aerossóis com diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) compreendido entre 1  $\mu\text{m}$  e 4  $\mu\text{m}$  e desvio-padrão geométrico ( $\sigma_g$ ) compreendido entre 1,5 e 3,0 (2)(9)(10). Deve fazer-se o razoavelmente possível para respeitar estas condições, sendo necessário um parecer especializado caso isso não se consiga. Por exemplo, as partículas dos fumos metálicos podem ser mais pequenas do que o limite inferior indicado, ao passo que as partículas carregadas, as fibras e as matérias higroscópicas (que aumentam de volume no ambiente húmido do aparelho respiratório) podem exceder o limite superior.

##### **Incorporação do produto químico em estudo num veículo**

16. Pode utilizar-se um veículo para obter a concentração e a granulometria adequadas do produto químico na atmosfera. Regra geral, deve preferir-se a água. As matérias em partículas podem ser sujeitas a processos mecânicos destinados a obter a distribuição granulométrica necessária, mas tendo o cuidado de não decompor nem alterar o produto químico em estudo. Quando houver indícios de que um processo mecânico possa ter alterado a composição do produto químico em estudo (por exemplo, devido às altas temperaturas geradas pela fricção numa moagem excessiva), será necessário verificá-la por meios analíticos. Devem tomar-se as precauções adequadas para não contaminar o produto químico em estudo. Não é necessário ensaiar matérias granulosas não friáveis intencionalmente formuladas para não serem inaláveis. Para demonstrar que a manipulação de uma matéria granulosa não gera partículas respiráveis, efetua-se um ensaio de desgaste. Se este gerar substâncias respiráveis, deve realizar-se um ensaio de toxicidade por inalação.

##### **Animais de controlo**

17. Não é necessário um grupo de controlo negativo (do ar) em paralelo. Caso se utilize um veículo diverso da água para gerar a atmosfera a ensaiar, só se utilizará um grupo de controlo do veículo se não se dispuser de dados históricos de toxicidade por inalação. Se um estudo de toxicidade de um produto químico incorporado num determinado veículo não revelar toxicidade, conclui-se que o veículo em causa não é tóxico à concentração ensaiada, não sendo necessário nenhum grupo de controlo do veículo.

#### **MONITORIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO**

##### **Caudal de ar nas câmaras**

18. Durante cada exposição, é necessário regular cuidadosamente, monitorizar continuamente e registar pelo menos de hora a hora o caudal de ar através de cada câmara. A monitorização da concentração (ou estabilidade) da atmosfera em estudo constitui uma medida permanente de todos os parâmetros dinâmicos e um meio indireto de regular os que intervêm na geração da atmosfera em estudo. É necessário ter especial cuidado em evitar reinalações nas câmaras de exposição unicamente nasal, evitando que o fluxo de ar através do sistema de

exposição seja incapaz de produzir uma circulação dinâmica da atmosfera que contém o produto químico em estudo. Existem metodologias a que pode recorrer-se para demonstrar que não ocorrem realiações nas condições experimentais escolhidas (2)(11). A concentração de oxigénio não deve ser inferior a 19 % e a concentração de dióxido de carbono não deve exceder 1 %. Se houver razões para crer que estas concentrações não são respeitadas, é necessário medi-las.

#### **Temperatura e humidade relativa nas câmaras**

19. Deve manter-se a temperatura nas câmaras a  $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ . Tanto no caso das exposições unicamente nasais como das exposições do corpo inteiro, é necessário monitorizar a humidade relativa na zona de respiração dos animais e registá-la pelo menos três vezes (duração do ensaio até quatro horas) ou de hora a hora (durações mais curtas). O ideal seria manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, mas isso pode não ser possível – por exemplo, quando se estudam misturas aquosas – ou pode não ser mensurável (devido a interferências do produto químico em estudo com o método de ensaio).

#### **Concentração nominal do produto químico em estudo**

20. Sempre que possível, deve calcular-se e registar-se a concentração nominal na câmara de exposição. Esta é dada pela divisão da massa gerada do produto químico em estudo pelo volume de ar total que circulou pelo sistema da câmara. A concentração nominal não é utilizada para caracterizar a exposição dos animais, mas a sua comparação com a concentração real dá uma indicação da eficácia de geração do sistema de ensaio, podendo ser utilizada para detetar problemas a esse nível.

#### **Concentração real do produto químico em estudo**

21. Entende-se por "concentração real do produto químico em estudo", a concentração do produto químico na zona de respiração dos animais da câmara de inalação. As concentrações reais podem determinar-se por métodos específicos (por exemplo, amostragem direta ou métodos de adsorção ou de reação química e posterior caracterização analítica) ou por métodos inespecíficos, tais como gravimetria após filtração. O método gravimétrico só é aceitável para aerossóis de pós com um único componente ou de líquidos pouco voláteis e deve apoiar-se em caracterizações adequadas específicas do produto químico em causa efetuadas antes da realização do estudo. A concentração de aerossóis de pós com vários componentes também pode determinar-se por gravimetria. Todavia, são necessários para isso dados analíticos que demonstrem que a composição do produto transportado no aerossol é semelhante à do produto inicial. Se não se dispuser desses dados, pode ser necessário reanalisar periodicamente o produto químico em estudo (idealmente no aerossol) durante o ensaio. No caso dos agentes aerossolizados que possam evaporar-se ou sublimar, é necessário demonstrar que todas as fases são recolhidas pelo método escolhido. As concentrações visadas, nominais e reais devem figurar no relatório do estudo, mas apenas as concentrações reais são utilizadas na análise estatística para cálculo dos valores letais de concentração.
22. Deve utilizar-se, se possível, apenas um lote do produto químico em estudo e a amostra em estudo deve ser conservada em condições que preservem a sua pureza, homogeneidade e estabilidade. Antes de iniciar o estudo, deve caracterizar-se o produto químico em causa no que respeita à sua pureza e, se tecnicamente viável, à sua identidade e às quantidades dos contaminantes e impurezas nele identificados. Para o efeito, pode recorrer-se, entre outros, a tempos de retenção e áreas relativa de picos, pesos moleculares obtidos por espectrometria de massa ou cromatografia em fase gasosa ou outras estimativas. Embora a identidade da amostra a estudar não seja da responsabilidade do laboratório, pode ser aconselhável que este confirme, pelo menos, alguns aspetos da caracterização efetuada pelo cliente (cor, natureza física, etc.).
23. Deve manter-se a atmosfera de exposição tão constante quanto possível e proceder-se à sua monitorização continuamente e/ou intermitentemente, consoante o método de análise. Caso se proceda a uma colheita de amostras intermitente, num estudo de quatro horas deve recolher-se uma amostra da atmosfera da câmara pelo menos duas vezes. Se, isso não for viável, por limitações relacionadas com o caudal de ar ou devido a concentrações baixas, pode colher-se uma amostra ao longo de todo o período de exposição. Se ocorrerem variações pronunciadas de uma amostra para outra, devem colher-se quatro amostras por exposição nas concentrações seguintes. A concentração na câmara correspondente a uma determinada amostra não deve desviar-se da concentração média mais de 10 %, no caso de gases e vapores, nem mais de 20 %, no caso de aerossóis de líquidos ou de sólidos. Deve calcular-se e registar-se o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio ( $t_{95}$ ). A duração da exposição corresponde ao tempo de geração do produto químico em estudo, incluído o tempo necessário para atingir  $t_{95}$ . O documento GD 39 (2) contém orientações para a estimativa do  $t_{95}$ .
24. No caso de misturas muito complexas de gases ou vapores e de aerossóis (por exemplo, atmosferas de combustão e produtos químicos gerados por produtos ou dispositivos finais específicos), o comportamento de cada fase na câmara de inalação pode ser diferente. Por esse motivo, deve escolher-se em cada fase (gás ou vapor e aerossol) pelo menos uma substância indicadora (substância analisada), normalmente a principal substância ativa da mistura. Se o produto químico em estudo for uma mistura, deve indicar-se no relatório a concentração analítica correspondente à mistura e não apenas a concentração correspondente à substância ativa ou ao componente (substância analisada) em causa. O documento GD 39 (2) contém mais informações sobre as concentrações reais.

### Distribuição granulométrica do produto químico em estudo

25. Deve determinar-se a distribuição granulométrica dos aerossóis pelo menos duas vezes durante cada exposição de quatro horas, recorrendo a um impactor de cascata ou a outro instrumento, tal como um granulómetro aerodinâmico. Se for possível demonstrar a equivalência dos resultados obtidos pelo impactor de cascata e pelo instrumento alternativo, pode utilizar-se este último em todo o estudo. Em paralelo ao instrumento primário, deve utilizar-se um segundo dispositivo, tal como um filtro gravimétrico ou um borbulhador de gás/impactor *impinger*, para confirmar a eficiência de captação do primeiro. As concentrações mássicas obtidas por análise granulométrica e por análise com filtros não devem diferir entre si mais do que valores razoáveis [ver o GD 39 (2)]. Se for possível demonstrar esta equivalência no início do estudo, não é necessário efetuar mais medições de confirmação. Por razões de bem-estar animal, devem ser tomadas medidas para minimizar dados inconclusivos que possam obrigar à repetição de exposições. É necessário efetuar uma análise granulométrica no caso dos vapores que possam condensar-se para formar aerossóis ou se forem detetadas partículas numa atmosfera de vapores suscetível de formar fases mistas (ver o ponto 15).

#### PROCEDIMENTO

26. São descritos a seguir dois tipos de estudo: o protocolo tradicional e o protocolo  $C \times t$ . Ambos podem compreender um estudo preliminar, um estudo principal e/ou um ensaio do limite (no protocolo tradicional) ou um ensaio a uma concentração-limite ( $C \times t$ ). Se um dos sexos for reconhecidamente mais sensível, fica ao critério do diretor do estudo efetuar estes estudos apenas a esse sexo. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Antes de iniciar o estudo deve atender-se a todos os dados disponíveis, a fim de minimizar a utilização de animais. Por exemplo, os dados gerados em aplicação do capítulo B.52 (4) deste anexo podem dispensar o estudo preliminar e servir para verificar se um dos sexos é mais sensível que o outro [ver o GD 39 (2)].

#### PROTOCOLO TRADICIONAL

##### Considerações gerais: protocolo tradicional

27. No estudo tradicional, expõem-se grupos de animais ao produto químico em estudo, durante um período fixo (geralmente quatro horas), numa câmara de exposição unicamente nasal ou de corpo inteiro. Os animais são expostos a uma concentração-limite (ensaio do limite) ou, num processo sequencial, a, pelo menos, três concentrações (estudo principal). O estudo principal pode ser antecedido de um estudo preliminar, a menos que já se disponha de determinadas informações sobre o produto químico, tais como as provenientes de um estudo B.52 já realizado [ver o GD 39 (2)].

##### Estudo preliminar: protocolo tradicional

28. Recorre-se a um estudo preliminar para estimar a potência do produto químico, identificar diferenças de sensibilidade entre sexos e facilitar a escolha dos níveis de concentração de exposição para o estudo principal ou o ensaio do limite. Ao selecionar os níveis de concentração para o estudo preliminar, deve atender-se a todos os dados disponíveis, nomeadamente dados relativos a produtos químicos similares e dados (Q)SAR eventualmente disponíveis. A cada concentração, expõem-se, no máximo, três machos e três fêmeas (podem ser necessários três animais por sexo para determinar uma diferença de sensibilidade entre sexos). O estudo preliminar pode incidir apenas numa concentração, mas podem ser ensaiadas mais se for necessário. Neste estudo não devem ensaiar-se tantos animais e concentrações como num estudo principal. Em vez do estudo preliminar, pode recorrer-se a um estudo B.52 (4) efetuado anteriormente [ver o GD 39 (2)].

##### Ensaio do limite: protocolo tradicional

29. Efetua-se este ensaio caso se saiba ou preveja que o produto químico em estudo é praticamente não tóxico, isto é, só induzirá toxicidade acima da concentração-limite prevista na regulamentação aplicável. No ensaio do limite, expõe-se a uma concentração-limite do produto químico em estudo um único grupo de três machos e três fêmeas. Podem obter-se informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo a partir de ensaios já realizados com produtos químicos semelhantes, tomando em consideração a identidade e percentagem dos componentes de importância toxicológica reconhecida. Nos casos em que se disponha de pouca ou nenhuma informação sobre a toxicidade do produto químico em estudo ou quando este for previsivelmente tóxico, deve efetuar-se o estudo principal.
30. A escolha das concentrações-limite depende geralmente da regulamentação aplicável. Quando se trata do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, as concentrações-limite aplicáveis são 20 000 ppm para gases, 20 mg/l para vapores e 5 mg/l para aerossóis (ou a concentração máxima atingível) (3). Pode ser tecnicamente difícil gerar as concentrações-limite no caso de determinados produtos químicos, em especial quando se trata de vapores ou de aerossóis. Ao ensaiar aerossóis, o principal objetivo é conseguir obter partículas de dimensões respiráveis (MMAD compreendido entre 1 µm e 4 µm), o que, com a maior parte dos produtos químicos, se consegue a uma concentração de 2 mg/l. Só deve tentar-se ensaiar aerossóis a concentrações superiores a 2 mg/l se for possível gerar partículas de dimensões respiráveis [ver o GD 39 (2)]. Por razões de bem-estar animal, o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (3) desaconselha o ensaio de concentrações superiores à concentração-limite. Só importa ponderar o ensaio da concentração-limite se for elevada a probabilidade de os resultados desse ensaio terem interesse direto para a proteção da saúde humana (3), o que deve justificar-se no relatório do estudo. No caso de produtos químicos potencialmente explosivos, devem tomar-se precauções para evitar condições favoráveis à ocorrência de explosões. Para evitar a utilização desnecessária de animais, deve efetuar-se um ensaio sem animais antes do ensaio do limite, para verificar se é possível atingir as condições deste ensaio nas câmaras.



31. Se a concentração-limite gerar mortalidade ou animais moribundos, os resultados do ensaio do limite podem servir de estudo preliminar para os ensaios seguintes a outras concentrações (ver o estudo principal). Se as propriedades físicas ou químicas do produto químico em estudo impossibilitarem que se atinja a concentração-limite, deve ensaiar-se a concentração máxima que se consiga atingir. Se a letalidade verificada à concentração máxima atingível for inferior a 50 %, não são necessários mais ensaios. Se não for possível atingir as concentrações-limite devem constar do relatório do estudo uma explicação disso e dados corroborantes. Se a concentração máxima atingível de um vapor não induzir toxicidade, pode ser necessário gerar o produto químico em estudo sob a forma de um aerossol de líquido.

#### **Estudo principal: protocolo tradicional**

32. Num estudo principal utilizam-se, normalmente, cinco machos e cinco fêmeas (ou cinco animais do sexo sensível, se for conhecido) por nível de concentração, sendo que o número mínimo de níveis é três. O número de níveis de concentração utilizado deve permitir efetuar uma análise estatística sólida. O intervalo de tempo entre a exposição dos diversos grupos é determinado pelo aparecimento, pela duração e pela intensidade dos sinais de toxicidade observados. Não se expõem animais ao nível de concentração seguinte enquanto não houver um grau razoável de confiança na sobrevivência dos últimos animais expostos. O diretor do estudo pode, então, ajustar a concentração visada para o próximo grupo a expor. Dada a dependência de tecnologias sofisticadas, este procedimento nem sempre será possível nos estudos por inalação, pelo que a exposição de animais ao nível de concentração seguinte deve basear-se na experiência adquirida e numa apreciação científica. Ao ensaiar misturas, deve consultar-se o documento GD 39 (2).

PROTOCOLO "CONCENTRAÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO" ( $C \times t$ )

#### **Considerações gerais: Protocolo $C \times t$**

33. Na avaliação da toxicidade por inalação, um estudo sequencial  $C \times t$  pode constituir alternativa ao protocolo tradicional (12)(13)(14). Neste método, Os animais são expostos durante diversos períodos a várias concentrações do produto químico em estudo. Todos os ensaios são efetuados numa câmara de exposição unicamente nasal, pois as câmaras de corpo inteiro não se prestam a este protocolo. O procedimento sequencial descrito no apêndice 1 ilustra este protocolo. Uma análise de simulação mostrou que tanto o protocolo tradicional como o protocolo  $C \times t$  podem gerar valores fiáveis de  $CL_{50}$ , embora este último seja geralmente melhor para obter valores fiáveis de  $CL_{01}$  e  $CL_{10}$  (15).
34. Uma análise de simulação demonstrou que é geralmente adequado utilizar dois animais por ponto ( $C,t$ ) – um animal de cada sexo, se forem utilizados ambos os sexos, ou dois animais do sexo mais sensível – para ensaiar quatro concentrações e cinco durações de exposição num estudo principal. Em certas circunstâncias, fica ao critério do diretor do estudo utilizar dois ratos de cada sexo em cada ponto ( $C,t$ ) (15). A utilização de dois animais de cada sexo em cada ponto ( $C,t$ ) pode reduzir os erros sistemáticos e a variabilidade das estimativas, aumentar a taxa de êxito destas últimas e melhorar a cobertura do intervalo de confiança. Todavia, se a correlação dos dados não for suficiente para possibilitar uma estimativa quando se utiliza um animal de cada sexo ou dois animais do sexo mais sensível, uma quinta concentração de exposição também poderá bastar para o efeito. Para mais orientações sobre o número de animais e as concentrações a utilizar num estudo  $C \times t$ , consultar o documento GD 39 (2).

#### **Estudo preliminar: Protocolo $C \times t$**

35. Recorre-se a um estudo preliminar para estimar a potência do produto químico e facilitar a escolha dos níveis de concentração de exposição para o estudo principal. Para selecionar uma concentração inicial adequada para o estudo principal e minimizar o número de animais utilizados, pode ter de se efetuar um estudo preliminar com um máximo de três animais de cada sexo a cada concentração – mais elementos no apêndice III do documento GD 39 (2). Pode ser necessário utilizar três animais de cada sexo para determinar a diferença de sensibilidade entre sexos. Expõem-se estes animais durante um período único de, geralmente, 240 minutos. A viabilidade de se gerarem as atmosferas de ensaio adequadas deve ser avaliada em ensaios técnicos prévios realizados sem animais. Caso se disponha de dados de mortalidade obtidos num estudo B.52 (4), geralmente não é necessário efetuar um estudo preliminar. Para selecionar a concentração inicial visada num estudo B.2, o diretor do estudo deve atender aos perfis de mortalidade observados a todas as concentrações ensaiadas nos estudos B.52 (4) realizados com ambos os sexos de cujos resultados disponha [ver o GD 39 (2)].

#### **Concentração inicial: protocolo $C \times t$**

36. A concentração inicial (sessão de exposição I no apêndice 1) é uma concentração-limite ou uma concentração escolhida pelo diretor do estudo com base no estudo preliminar. Expõem-se grupos de um animal de cada sexo a esta concentração durante diversos períodos (por exemplo, 15, 30, 60, 120 ou 240 minutos), num total de dez animais (sessão de exposição I no apêndice 1).
37. A escolha das concentrações-limite depende geralmente da regulamentação aplicável. Quando se trata do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, as concentrações-limite aplicáveis são 20 000 ppm para gases, 20 mg/l para vapores e 5 mg/l para aerossóis (ou a concentração máxima atingível) (3). Pode ser tecnicamente difícil gerar as concentrações-limite no caso de determinados produtos químicos, em especial quando se trata de vapores ou de aerossóis. Ao ensaiar aerossóis, o objetivo é conseguir obter partículas de dimensões respiráveis (MMAD compreendido entre 1  $\mu$ m e 4  $\mu$ m) na concentração-limite de 2 mg/l, o que é possível no caso da maior parte dos produtos químicos. Só deve tentar-se ensaiar aerossóis a concentrações superiores a 2 mg/l se for possível gerar partículas de dimensões respiráveis [ver o GD 39 (2)]. Por razões de bem-estar animal, o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (3) desaconselha o ensaio de concentrações superiores à concentração-limite.

Só importa ponderar ensaios a concentrações superiores a essa concentração se for elevada a probabilidade de os resultados desses ensaios terem interesse direto para a proteção da saúde humana (3), o que deve justificar-se no relatório do estudo. No caso de produtos químicos potencialmente explosivos, devem tomar-se precauções para evitar condições favoráveis à ocorrência de explosões. Para evitar a utilização desnecessária de animais, deve efetuar-se um ensaio sem animais antes de ensaiar a concentração inicial, para verificar se é possível atingir nas câmaras as condições correspondentes a essa concentração.

38. Se a concentração inicial gerar mortalidade ou animais moribundos, os resultados obtidos para esta concentração podem servir de ponto de partida para os ensaios seguintes a outras concentrações (ver o estudo principal). Se as propriedades físicas ou químicas do produto químico em estudo impossibilitarem que se atinja a concentração-limite, deve ensaiar-se a concentração máxima que se consiga atingir. Se a letalidade verificada à concentração máxima atingível for inferior a 50 %, não são necessários mais ensaios. Se não for possível atingir a concentração-limite, devem constar do relatório do estudo uma explicação disso e dados corroborantes. Se a concentração máxima atingível de um vapor não induzir toxicidade, pode ser necessário gerar o produto químico em estudo sob a forma de um aerossol de líquido.

#### **Estudo principal: protocolo C × t**

39. A concentração inicial (sessão de exposição I no apêndice 1) ensaiada no estudo principal é uma concentração-limite ou uma concentração escolhida pelo diretor do estudo com base no estudo preliminar. Se for observada mortalidade durante ou após a sessão de exposição I, deve tomar-se a exposição mínima (C × t) que gera mortalidade como orientação para determinar a concentração e os períodos de exposição para a sessão de exposição II. Cada sessão de exposição subsequente dependerá da sessão que a precede (ver o apêndice 1).
40. No caso de muitos produtos químicos, os resultados obtidos para a concentração inicial, juntamente com os resultados obtidos em três sessões de exposição suplementares menos espaçadas (sendo este espaçamento dado pelo fator que define a série geométrica de períodos de exposição, geralmente  $\sqrt{2}$ ) são suficientes para estabelecer a relação entre C × t e a mortalidade (15), mas pode ser vantajoso utilizar uma quinta concentração de exposição – ver o apêndice 1 e o documento GD 39 (2). O apêndice 1 explica o tratamento matemático dos resultados do protocolo C × t.

#### **EXAMES**

41. Os animais devem ser examinados clinicamente com frequência durante o período de exposição. Depois desta, deve efetuar-se um exame clínico pelo menos duas vezes no dia da exposição – ou mais vezes, quando a resposta dos animais à exposição o aconselhar – e pelo menos uma vez por dia em seguida, durante 14 dias. Não é fixada uma duração do período de observação, que deve depender da natureza e do momento do aparecimento de sinais clínicos, assim como da duração do período de recuperação. O momento do aparecimento e do desaparecimento dos sinais de toxicidade é importante, nomeadamente se houver uma certa demora na manifestação desses sinais. Todas as observações devem ser sistematicamente registadas, mantendo registos individuais para cada animal. Os animais moribundos ou que apresentem sinais de dor intensa e/ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados, por razões de bem-estar animal. No exame clínico de sinais de toxicidade, não devem confundir-se um mau aspeto inicial e alterações respiratórias passageiras, imputáveis ao procedimento de exposição, com sinais de toxicidade do produto químico em estudo passíveis de aconselhar a eutanásia prematura dos animais. Devem ser tidos em conta (7) os princípios e critérios resumidos no documento de orientações n.º 19 da OCDE (GD 19). Se forem eutanasiados animais ou forem encontrados animais mortos, deve registar-se o momento da morte com a maior exatidão possível.
42. Os exames a efetuar aos animais engaiolados devem incidir, nomeadamente, nas alterações da pele e da pelagem, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do sistema circulatório, dos sistemas nervosos autónomo e central, da atividade somatomotora e do comportamento. Se possível, registar as diferenças eventualmente observadas entre efeitos locais e sistémicos. Deve estar-se atento a tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. A medição da temperatura retal pode corroborar uma bradipneia reflexa ou uma hipo/hipertermia relacionadas com a exposição ou com o confinamento.

#### **Peso corporal**

43. Regista-se o peso de cada animal uma vez durante o período de aclimação, no dia da exposição, antes desta (dia 0), e, pelo menos, nos dias 1, 3 e 7 (e posteriormente uma vez por semana), bem como no momento da morte ou da eutanásia, se posterior ao dia 1. O peso corporal é reconhecidamente um indicador crítico de toxicidade, pelo que é necessário observar atentamente os animais cujo peso decresça 20 % ou mais relativamente ao peso anterior ao estudo e não volte a aumentar. No final do período após a exposição, pesam-se e eutanasiam-se os animais sobreviventes.

#### **Patologia**

44. Os animais utilizados nos ensaios (incluindo os que morrerem durante o ensaio ou que forem eutanasiados e retirados do estudo por razões de bem-estar animal) devem ser sujeitos a uma autópsia macroscópica. Se não for possível realizar a autópsia imediatamente depois de detetada a morte do animal, este deve ser refrigerado (não congelado) a uma temperatura suficientemente baixa para minimizar a autólise. As autópsias devem ser efetuadas o mais rapidamente possível, normalmente não mais de um ou dois dias após a morte. Regista-se todas as alterações patológicas macroscópicas de cada animal, prestando especial atenção às alterações do aparelho respiratório.

45. Podem ser efetuados outros exames previamente previstos para alargar o valor interpretativo do estudo, tais como a pesagem dos pulmões dos ratos sobreviventes e/ou a pesquisa, por exame microscópico, de irritações do aparelho respiratório. Também podem examinar-se os órgãos que evidenciem macropatologias de animais que tenham sobrevivido 24 horas ou mais, bem como órgãos que se saiba serem afetados ou que se preveja serem-no. O exame microscópico de todo o aparelho respiratório pode fornecer elementos úteis no caso dos produtos químicos que reagem com a água, tais como os ácidos e os produtos químicos higroscópicos.

#### DADOS E RELATÓRIOS

##### Dados

46. Devem ser indicados o peso corporal e os resultados da autópsia de cada animal. Devem ser resumidos os resultados dos exames clínicos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentaram sinais específicos de toxicidade, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados e o momento da morte de cada animal, complementados por uma descrição dos efeitos tóxicos e da evolução e reversibilidade destes, bem como pelos resultados das autópsias.

##### Relatório dos ensaios

47. Elementos a constar, quando pertinente, do relatório dos ensaios:

###### *Animais estudados e condições em que são mantidos*

- descrição das condições de engaiolamento, nomeadamente: número (ou alteração do número) de animais por gaiola, camas, temperatura e humidade relativa ambientes, fotoperíodo e dieta,
- espécie e estirpe utilizadas e, caso não sejam utilizados ratos, justificação da utilização de outra espécie,
- número, idade e sexo,
- método de aleatorização,
- elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),
- descrição de eventuais condicionamentos anteriores ao ensaio, nomeadamente ao nível da dieta, de quarentenas e do tratamento de doenças.

###### *Produto químico em estudo*

- natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas pertinentes (incluindo a isomerização),
- dados de identificação e, se for conhecido, número de registo CAS (*Chemical Abstract Service*).

###### *Veículo*

- justificação da utilização e da escolha do veículo (se não for água),
- dados históricos ou paralelos demonstrativos de que o veículo não interfere nos resultados do estudo.

###### *Câmaras de inalação*

- descrição – incluindo dimensões e volume – das câmaras de inalação,
- origem e descrição do equipamento utilizado na exposição dos animais e na geração da atmosfera,
- equipamento de medição da temperatura, humidade, granulometria e concentração real,

- fonte de ar, tratamento do ar fornecido/evacuado e sistema de climatização utilizado,
- métodos utilizados para calibrar o equipamento a fim de garantir a homogeneidade da ensaiada,
- subpressão ou sobrepressão,
- pontos de exposição por câmara (de exposição unicamente nasal); localização dos animais no sistema (câmara de exposição de corpo inteiro),
- homogeneidade/estabilidade no tempo da atmosfera ensaiada,
- localização nas câmaras dos sensores térmicos e higrométricos e dos pontos de colheita de amostras da atmosfera ensaiada,
- caudais de ar, caudal de ar em cada ponto de exposição (exposição unicamente nasal) ou relação entre o volume ocupado pelos animais e o volume da câmara (câmaras de exposição de corpo inteiro),
- informações sobre o equipamento eventualmente utilizado para medir o oxigénio e o dióxido de carbono,
- tempo necessário para as câmaras de inalação atingirem o equilíbrio ( $t_{95}$ ),
- número horário de substituições de volume,
- medidores (se existirem).

#### *Elementos relativos à exposição*

- fundamentação da escolha da concentração visada no estudo principal,
- concentrações nominais (dadas pela divisão da massa do produto químico em estudo introduzido na câmara de inalação pelo volume de ar total que nela circulou),
- concentrações reais do produto químico em estudo obtidas na zona de respiração dos animais; no caso das misturas que geram formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerossóis), pode analisar-se separadamente cada uma delas,
- as concentrações no ar devem ser indicadas em unidades de massa (mg/l, mg/m<sup>3</sup>, etc.), podem igualmente indicar-se unidades de volume (ppm, ppb, etc.) entre parêntesis,
- distribuição granulométrica, diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) e desvio-padrão geométrico ( $\sigma_g$ ), incluindo os métodos de cálculo correspondentes; indicar também o resultado de cada análise granulométrica efetuada.

#### *Condições de realização dos ensaios*

- elementos sobre a preparação do produto químico estudado, nomeadamente sobre eventuais métodos de redução da granulometria de sólidos ou de preparação de soluções do produto químico. Se o recurso a processos mecânicos for passível de ter alterado a composição do produto químico em estudo, incluir os resultados das análises efetuadas para verificar a composição deste,
- descrição (de preferência complementada por um esquema) do equipamento utilizado para gerar a atmosfera ensaiada e para expor os animais a essa atmosfera,
- elementos sobre o método de análise química utilizado e sobre a validação desse método (incluindo o rendimento da recuperação do produto químico em estudo do meio amostrado),
- fundamentação da escolha das concentrações utilizadas nos ensaios.

*Resultados*

- quadro com a temperatura, a humidade e o caudal de ar nas câmaras,
- quadro com as concentrações nominais e reais nas câmaras,
- quadro com os dados granulométricos, nomeadamente dados analíticos sobre a colheita de amostras, a distribuição granulométrica e os cálculos de MMAD e  $\sigma_g$ ,
- quadro com os dados de resposta e as concentrações correspondentes a cada animal (animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, com indicação da natureza, da intensidade, do momento do aparecimento e da duração dos efeitos),
- pesos corporais de cada animal registados durante o estudo; data e momento da morte, se anterior à eutanásia programada; aparecimento, evolução e eventual reversibilidade de sinais de toxicidade em cada animal,
- resultados da autópsia e resultados histopatológicos correspondentes a cada animal, se disponíveis,
- estimativas de letalidade (por exemplo, CL<sub>50</sub> e DL<sub>01</sub>), incluindo os intervalos de confiança a 95 % e o declive (se o método de avaliação o permitir),
- relação estatística, incluindo uma estimativa do expoente "n" (protocolo C × t). Indicar também o nome do *software* estatístico utilizado.

*Discussão e interpretação dos resultados*

- deve ser dada especial atenção à descrição dos métodos utilizados para satisfazer os critérios deste método de ensaio, nomeadamente no que respeita à concentração-limite e à granulometria,
- examinar em que medida, com base nos resultados globais, as partículas são respiráveis, em especial se os critérios granulométricos não forem satisfeitos,
- explicar por que razão terá sido necessário eutanasiar animais que apresentavam sinais de dor ou de grande sofrimento continuado, com base nos critérios do documento de orientações n.º 19 da OCDE, relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (8),
- explicar por que razão foram interrompidos ensaios segundo o capítulo B.52 (4) deste anexo para realizar ensaios segundo o método B.2, se assim tiver sucedido,
- a apreciação global do estudo deve incidir igualmente na coerência dos métodos utilizados para determinar as concentrações nominal e real e deve dar conta da relação entre estas concentrações,
- referir a causa provável da morte e o modo de ação predominante (sistémico ou local).

*REFERÊNCIAS:*

- (1) OCDE (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403. OCDE, Paris. Disponível em <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- (2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39. OCDE, Paris. Disponível em <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- (3) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).
- (4) Capítulo B.52 deste anexo, "Toxicidade aguda por inalação — Método de classificação de toxicidade aguda".

- (5) Capítulo B.40 deste anexo, "Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio da resistência elétrica transcutânea (RET)".
- (6) Capítulo B.40.A deste anexo, "Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio em modelos de pele humana".
- (7) OCDE (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435. OCDE, Paris. Disponível em <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- (8) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. OCDE, Paris. Disponível em <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- (9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18:321-327.
- (10) Phalen R.F. (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques (2nd Edition). Informa Healthcare, New York.
- (11) Pauluhn J., Thiel A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27:160-167.
- (12) Zwart J.H.E., Arts J.M., ten Berge W.F., Appelman L.M. (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 15:278-290.
- (13) Zwart J.H.E., Arts J.M., Klokman-Houweling E.D., Schoen E.D. (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. *Inhal. Toxicol.* 2:105-117.
- (14) Ten Berge W.F., Zwart A. (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. *J. Haz. Mat.* 21:65-71.
- (15) OCDE (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104. OCDE, Paris. Disponível em <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- (16) Finney D.J. (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

#### DEFINIÇÃO

**Produto químico em estudo:** Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

---

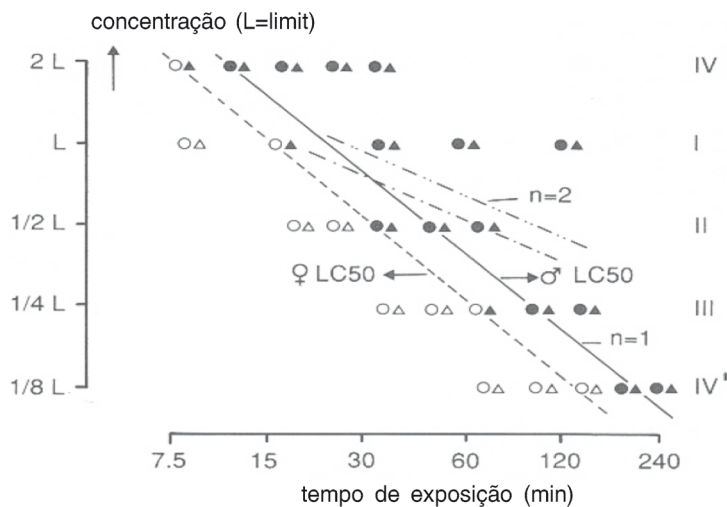
## Apêndice 1

## Protocolo C × t

1. Na avaliação da toxicidade por inalação, um estudo sequencial de concentração em função do tempo (C × t) pode constituir alternativa ao protocolo tradicional utilizado (12)(13)(14). O protocolo C × t deve ser privilegiado quando a regulamentação aplicável ou critérios científicos exigem o ensaio em animais durante vários períodos, nomeadamente para efeitos de planeamento da resposta a situações de emergência e de ordenamento do território. Este procedimento começa, normalmente, pelo ensaio de uma concentração-limite (sessão de exposição I), expondo os animais ao produto químico em estudo durante cinco períodos diferentes (por exemplo, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos), a fim de obter várias durações de exposição numa mesma sessão (ver a figura 1). Quando se trata do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, as concentrações-limite aplicáveis são 20 000 ppm para gases, 20 mg/l para vapores e 5 mg/l para aerossóis. Estes níveis só podem ser excedidos se assim o exigirem a regulamentação aplicável ou razões científicas (ver o ponto 37 do texto principal do método B.2).
2. Nos casos em que se disponha de pouca ou nenhuma informação sobre a toxicidade do produto químico em estudo, deve efetuar-se um estudo preliminar no qual, geralmente durante 240 minutos, se expõem grupos de não mais de três animais de cada sexo às concentrações visadas escolhidas pelo diretor do estudo.
3. Se, na sessão de exposição I, se ensaiar uma concentração-limite e a mortalidade observada for inferior a 50 %, não são necessários mais ensaios. Se a regulamentação aplicável ou razões científicas exigirem que seja determinada a relação entre a concentração, o tempo de exposição e a resposta a esta última a níveis superiores à concentração-limite indicada, a exposição seguinte deve ser efetuada a uma concentração superior, por exemplo, dupla daquela (2L na figura 1).
4. Se for observada toxicidade à concentração-limite, são necessários ensaios complementares (estudo principal). Essas exposições adicionais são efetuadas a concentrações inferiores (sessões de exposição II, III ou IV' na figura 1) ou a concentrações superiores com tempos de exposição mais curtos (sessão de exposição IV na figura 1), adaptados e não tão espaçados.
5. Efetua-se o ensaio (concentrações inicial e seguintes) com um animal de cada sexo por ponto (C,t) ou com dois animais do sexo mais sensível por ponto (C,t). Em determinadas circunstâncias, fica ao critério do diretor do estudo utilizar dois ratos de cada sexo por ponto (C,t) – ou quatro animais do sexo mais sensível por ponto (C,t) (15). A utilização de dois animais de cada sexo por cada ponto (C,t) normalmente reduz os erros sistemáticos e a variabilidade das estimativas, aumenta a taxa de êxito destas últimas e melhora a cobertura do intervalo de confiança, comparativamente ao protocolo aqui descrito. Para mais informações, consultar o documento GD 39 (2).
6. O ideal é efetuar cada sessão de exposição no seu dia. Este procedimento permite adiar a exposição seguinte até existir um grau razoável de confiança na sobrevivência dos animais e possibilita que o diretor do estudo adapte a concentração visada e os tempos de exposição para a sessão seguinte. Recomenda-se começar cada sessão de exposição pelo grupo que será exposto durante mais tempo — no exemplo dado, pelo grupo de 240 minutos de exposição, seguindo-se o grupo de 120 minutos e assim por diante. Se, por exemplo, após 90 minutos, os animais do grupo de 240 minutos estiverem a morrer ou revelarem sinais de toxicidade intensos (por exemplo, alterações extremas da respiração, nomeadamente dificuldades respiratórias), não fará sentido expor um grupo durante 120 minutos, pois a mortalidade dos animais seria provavelmente de 100 %. Nessas circunstâncias, o diretor do estudo deverá selecionar tempos de exposição mais curtos para a concentração em causa (por exemplo, 90, 65, 45, 33 e 25 minutos).
7. Deve medir-se com frequência a concentração na câmara, para determinar a concentração média no tempo para cada duração de exposição. Se possível, deve utilizar-se na análise estatística o momento da morte de cada animal, não a duração da exposição.
8. Uma vez efetuadas as quatro primeiras sessões de exposição, examinam-se os resultados obtidos para verificar se definem suficientemente uma curva da concentração em função do tempo (ver a figura 1). Se isso não acontecer, pode efetuar-se uma exposição suplementar (5.ª concentração). A concentração e os tempos de exposição utilizados na 5.ª exposição devem ser escolhidos de forma a obter os dados em falta.
9. Utilizam-se todas as sessões de exposição (incluída a primeira) para calcular a relação entre a concentração, o tempo de exposição e a resposta a esta última por análise estatística (16). Se possível, deve utilizar-se para cada ponto (C,t) a concentração média no tempo e o tempo de exposição até à morte (se ocorrer durante a exposição).

Figura 1

Exemplo hipotético de uma relação entre a concentração, o tempo de exposição e a mortalidade causada no rato



Símbolos só com contorno: animais sobreviventes; símbolos a cheio: animais mortos;

Triângulos: fêmeas; círculos: machos;

Linha a cheio: valores de  $CL_{50}$  (7,5 a 240 minutos) correspondentes a machos ( $n = 1$ );

Linha a tracejado: valores de  $CL_{50}$  (7,5 a 240 minutos) correspondentes a fêmeas ( $n = 1$ );

Linhas com traçado e ponteados: linhas de valores hipotéticos de  $CL_{50}$  para machos e fêmeas com  $n = 2$  (12).

Glossário

concentração;

tempo de exposição.

10. Exemplo do procedimento sequencial:

#### Sessão de exposição I — Ensaio à concentração-limite (ver a figura 1)

- Um animal de cada sexo por ponto (C,t); 10 animais no total <sup>(a)</sup>;
- Concentração visada <sup>(b)</sup> = concentração-limite;
- Exposição de cinco grupos de animais a esta concentração visada durante 15, 30, 60, 120 e 240 minutos, respetivamente.

↓

#### Sessão de exposição II <sup>(c)</sup> — Estudo principal

- Um animal de cada sexo por ponto (C,t); 10 animais no total;

<sup>(a)</sup> Se não se dispuser de informações sobre a sensibilidade de cada sexo, utilizam-se ratos de ambos os sexos, isto é, um animal de cada sexo para cada concentração. Com base nas informações disponíveis, ou caso durante esta sessão de exposição se verifique que um dos sexos é mais sensível, utilizam-se 10 animais desse sexo – dois animais por ponto (C,t) – a cada concentração no resto do ensaio.

<sup>(b)</sup> Quando se trata do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, as concentrações-limite aplicáveis são 20 000 ppm para gases, 20 mg/l para vapores e 5 mg/l para aerossóis. Caso se preveja toxicidade, ou se os resultados do estudo preliminar o aconselharem, devem escolher-se concentrações iniciais mais baixas. Se a regulamentação aplicável o exigir ou razões científicas o aconselharem, podem utilizar-se concentrações maiores.

<sup>(c)</sup> Idealmente, não se expõem animais ao nível de concentração seguinte enquanto não houver um grau razoável de confiança na sobrevivência dos últimos animais expostos. O diretor do estudo pode, então, ajustar a concentração visada e os tempos de exposição para a próxima sessão de exposição.



- Exposição de cinco grupos de animais a uma concentração mais baixa <sup>(d)</sup> (1/2L), aumentando ligeiramente a duração das exposições (espaçamento de  $\sqrt{2}$ ; ver a figura 1).

↓

#### Sessão de exposição III — Estudo principal

- Um animal de cada sexo por ponto (C,t); 10 animais no total;
- Exposição de cinco grupos de animais a uma concentração mais baixa <sup>(d)</sup> (1/4L), aumentando ligeiramente a duração das exposições (espaçamento de  $\sqrt{2}$ ; ver a figura 1).

↓

#### Sessão de exposição IV — Estudo principal

- Um animal de cada sexo por ponto (C,t); 10 animais no total;
- Exposição de cinco grupos de animais a uma concentração mais baixa <sup>(d)</sup> (1/8 L), aumentando ligeiramente a duração das exposições (espaçamento de  $\sqrt{2}$ ; ver a figura 1).

↓ ou

#### Sessão de exposição IV — Estudo principal

- Um animal de cada sexo por ponto (C,t); 10 animais no total;
- Exposição de cinco grupos de animais a uma concentração mais elevada <sup>(e)</sup> (2L), diminuindo ligeiramente a duração das exposições (espaçamento de  $\sqrt{2}$ ; ver a figura 1).

#### Tratamento matemático dos resultados do protocolo C × t

11. O procedimento C × t gerará 20 ou 25 pontos, consoante se utilizem quatro ou cinco concentrações durante cinco períodos de exposição. Com base nesses pontos, pode calcular-se a relação C × t recorrendo à seguinte análise estatística (16):

Equação 1:

$$\text{Probit}(P) = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t$$

em que C é a concentração e t é o tempo de exposição; ou

Equação 2:

$$\text{Resposta} = f(C^n t)$$

em que  $n = b_1/b_2$ .

Recorrendo à equação 1, pode calcular-se o valor de CL<sub>50</sub> correspondente a um determinado período (por exemplo, 4 h, 1 h, 30 minutos ou qualquer outro período da gama de tempos de exposição ensaiados) utilizando P = 5 (50 % de resposta). De notar que a regra de Haber só se aplica se n = 1. Pode calcular-se a CL<sub>01</sub> utilizando P = 2,67.

<sup>(d)</sup> A dose mínima (C × t) que produz mortalidade no ensaio à concentração inicial (primeira sessão de exposição) utiliza-se como orientação para estabelecer a próxima combinação de concentração e tempos de exposição. Normalmente, reduz-se a concentração a metade (1/2L) e Os animais são expostos durante períodos menos espaçados, distribuídos em série geométrica de fator 1,4 ( $\sqrt{2}$ ; ver a referência 11) à volta do tempo correspondente à dose letal mínima (t × C) observada na primeira exposição. A figura 1 mostra que, na sessão de exposição I, se observou mortalidade pela primeira vez ao fim de 15 minutos, pelo que os tempos de exposição da sessão II, centrados nos 30 minutos, foram 15, 21 30, 42 e 60 minutos. Depois das duas primeiras exposições, é fortemente recomendado que se representem graficamente os dados conforme se fez na figura 1, verificando se a relação entre a concentração e o tempo define um ângulo de 45 graus (n = 1) ou se a relação entre a concentração, o tempo de exposição e a resposta a esta última tem um declive menor (por exemplo, n = 2) ou maior (por exemplo, n = 0,8). Nestes últimos casos, é fortemente recomendado que se adaptem em conformidade os tempos de exposição e concentrações seguintes.

<sup>(e)</sup> Em determinados casos, pode ser necessário aumentar a concentração (2L) e associar-lhe novos tempos de exposição menos espaçados, distribuídos em série geométrica de fator 1,4 ( $\sqrt{2}$ ) à volta do tempo correspondente à concentração letal mínima observada na primeira exposição. É preferível que a duração mínima da exposição seja superior a cinco minutos, não devendo a duração máxima exceder 8 horas.»

4) Os capítulos B.7 e B.8 são substituídos pelos seguintes textos:

«B.7 ESTUDO DA TOXICIDADE ORAL POR DOSE REPETIDA DURANTE 28 DIAS EM ROEDORES

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline 407* (2008) da OCDE. O *Test Guideline 407* inicial foi adotado em 1981. Em 1995, adotou-se uma versão revista, para obter mais dados sobre os animais estudados, nomeadamente ao nível da neurotoxicidade e da imunotoxicidade.
2. Em 1998, a OCDE deu início a uma ação prioritária com vista à revisão dos *Test Guidelines* existentes e à elaboração de novos *Test Guidelines* para despistagem e ensaio de potenciais desreguladores do sistema endócrino (8). Um dos elementos dessa ação foi a atualização do *Test Guideline* da OCDE relativo ao estudo da toxicidade oral por dose repetida durante 28 dias em roedores (TG 407), nele introduzindo parâmetros adequados à deteção da atividade endócrina de produtos químicos. O protocolo adotado foi então sujeito a um vasto programa internacional destinado a examinar a pertinência e viabilidade desses parâmetros adicionais, o desempenho dos mesmos relativamente a produtos químicos com atividade (anti)estrogénica, (anti)androgénica e (anti)tiroideia, a repetibilidade intralaboratorial e a reprodutibilidade interlaboratorial e as interferências dos novos parâmetros com os anteriormente previstos no TG 407. A OCDE elaborou em seguida um relatório muito completo (9) com a compilação e avaliação pormenorizada dos múltiplos dados obtidos nesse exercício. A presente atualização do método B.7 equivale ao TG 407 e é fruto da experiência e dos resultados obtidos durante o referido programa internacional. O método permite contextualizar determinados efeitos de mediação endócrina com outros efeitos toxicológicos.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

3. Na apreciação e avaliação das características de toxicidade de produtos químicos, pode determinar-se a toxicidade oral por dose repetida depois de obter informações sobre a toxicidade aguda a partir de ensaios realizados para o efeito. Este método destina-se ao estudo de efeitos tóxicos numa grande diversidade de alvos potenciais de toxicidade. Fornece informações sobre os perigos para a saúde que podem advir da exposição repetida num período relativamente curto, nomeadamente ao nível de efeitos nos sistemas nervoso, imunitário e endócrino. Nestes domínios específicos, pretende-se identificar os produtos químicos potencialmente neurotóxicos, passíveis de justificar o aprofundamento do estudo desta vertente, bem como os que interferem com a fisiologia da tiroide, podendo o método fornecer igualmente dados sobre os produtos químicos que afetam os órgãos reprodutores de animais adultos jovens de ambos os sexos e dar indicações sobre efeitos imunológicos.
4. Os resultados obtidos por este método podem ser utilizados na identificação de perigos e na avaliação de riscos. Os resultados correspondentes aos parâmetros relacionados com o sistema endócrino devem interpretar-se com base no documento "*Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*" (11), elaborado pela OCDE, que estabelece um quadro conceptual para o ensaio e a avaliação de produtos químicos desreguladores do sistema endócrino. O método compreende um estudo básico de toxicidade por dose repetida, que pode utilizar-se para produtos químicos que não justifiquem um estudo a 90 dias (por exemplo, se o volume de produção não exceder determinados limites) ou como etapa prévia para um estudo a longo prazo. O tempo de exposição previsto é de 28 dias.
5. O programa internacional de validação de parâmetros adequados para a deteção da atividade endócrina potencial de produtos químicos mostrou que a qualidade dos dados obtidos pelo método B.7 depende muito da experiência do laboratório que realiza os ensaios. Este problema coloca-se especificamente em relação à determinação histopatológica de alterações cíclicas dos órgãos reprodutores femininos e à pesagem dos pequenos órgãos hormonodependentes, difíceis de dissecar. Foi elaborado um documento de orientações no domínio da histopatologia (19), que está disponível no sítio Web público da OCDE relativo aos *Test Guidelines* e visa ajudar os patologistas nos exames que realizam e contribuir para melhorar a sensibilidade do ensaio. Foram incorporados neste método diversos parâmetros que se verificou constituírem indicadores de efeitos tóxicos ao nível endócrino. Enumeram-se no apêndice 2, como parâmetros facultativos, aqueles cuja utilidade não está provada, por insuficiência de dados, ou cujo contributo para a deteção de desreguladores do sistema endócrino o programa de validação não demonstrou suficientemente.
6. Com base nos dados gerados no processo de validação, importa sublinhar que a sensibilidade deste ensaio não é suficiente para identificar todas as substâncias (anti)androgénicas ou (anti)estrogénicas (9). O método não é aplicado a um estágio da vida especialmente sensível à desregulação endócrina. Todavia, durante o processo de validação, identificaram-se por este método substâncias que afetam ligeira ou fortemente a função tiroideia e substâncias com atividade endócrina moderada a forte através dos recetores estrogénicos ou androgénicos, embora raramente tenha sido possível identificar substâncias com fraca atividade a esse nível. Não pode, portanto, considerar-se um ensaio de despistagem de atividade endócrina.
7. O facto de não se evidenciarem efeitos de natureza (anti)androgénica ou (anti)estrogénica não pode, portanto, entender-se como uma prova da inexistência de efeitos no sistema endócrino. No que respeita a efeitos mediados pelo sistema endócrino, a caracterização das substâncias não deve, pois, basear-se unicamente nos resultados obtidos por aplicação deste método de ensaio. Para caracterizar uma potencial atividade endócrina, estes resultados devem ser examinados juntamente com todos os dados disponíveis para o produto químico em causa, numa perspetiva de suficiência de prova. Por conseguinte, as decisões normativas sobre atividade endócrina (ao nível da caracterização de substâncias) devem fundamentar-se numa base mais alargada, não se apoiando unicamente nos resultados obtidos pelo presente método.

8. Pressupõe-se que todos os procedimentos com animais respeitarão as normas locais de manipulação de animais. As descrições, neste protocolo, dos cuidados a ter com os animais e do tratamento a dar aos animais são normas mínimas, prevalecendo, se for mais estrita, a regulamentação local. Para mais orientações sobre o tratamento ético de animais, ver o documento da OCDE com a referência 14.
9. Definem-se no apêndice 1 alguns conceitos utilizados.

#### PRINCÍPIO DO MÉTODO

10. Administra-se diariamente por via oral o produto químico em estudo a vários grupos de animais, em doses crescentes de grupo para grupo, durante um período de 28 dias. No decurso deste período, verifica-se atentamente todos os dias se os animais evidenciam sinais de toxicidade. Autopsia-se os animais que morrem ou são eutanasiados durante os ensaios. No final dos ensaios, eutanasiam-se e autopsia-se os animais sobreviventes. Este estudo durante 28 dias fornece informações sobre os efeitos da exposição repetida por via oral e pode revelar a necessidade de estudos complementares mais longos. Pode igualmente fornecer informações que facilitem a escolha das concentrações a utilizar nesses estudos durante períodos mais longos. Os dados gerados pela aplicação deste método devem possibilitar a caracterização da toxicidade do produto químico estudado, fornecer indicações sobre a resposta às doses administradas e permitir determinar o NOAEL (nível sem observação de efeitos adversos).

#### DESCRIÇÃO DO MÉTODO

##### **Escolha da espécie animal**

11. Embora possa recorrer-se a outros roedores, a espécie preferida é o rato. Se os parâmetros especificados neste método forem estudados noutra espécie de roedor, é necessário justificá-lo pormenorizadamente. Embora, em termos biológicos, seja plausível que outras espécies respondam aos produtos tóxicos de modo semelhante ao rato, o recurso a espécies mais pequenas pode aumentar a variabilidade, devido às dificuldades técnicas que a dissecação dos órgãos mais pequenos coloca. O rato foi a única espécie utilizada no programa internacional de validação da deteção de desreguladores do sistema endócrino. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas. A administração do produto químico em estudo deve ter início logo que possível após o desmame, mas sempre antes de os animais completarem nove semanas. No início do estudo, as diferenças de peso entre os animais utilizados devem ser mínimas, não se desviando mais de 20 % do peso médio de cada sexo. Se o estudo de toxicidade oral por dose repetida constituir uma etapa preliminar de um estudo a longo prazo, devem ser utilizados animais da mesma estirpe e proveniência em ambos os casos.

##### **Condições de alojamento e de alimentação**

12. Todos os procedimentos devem respeitar as normas locais de manipulação de animais de laboratório. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ( $\pm$  3 °C). A humidade relativa não deve ser inferior a 30 % e, de preferência, não deve exceder 70 %, exceto durante a limpeza do biotério. Idealmente, deve procurar manter-se entre 50 % e 60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições. Se o produto químico em estudo for administrado com os alimentos, a escolha da dieta pode ser condicionada pela necessidade de assegurar uma mistura adequada. Os animais devem ser alojados em pequenos grupos do mesmo sexo, embora possam ser alojados individualmente se houver razões científicas que o justifiquem. Em caso de alojamento coletivo, cada gaiola não deve alojar mais de cinco animais.
13. Deve efetuar-se com regularidade uma pesquisa de contaminantes nos alimentos fornecidos e conservar-se uma amostra da dieta até o relatório estar concluído.

##### **Preparação dos animais**

14. Distribuem-se aleatoriamente animais adultos, jovens e saudáveis pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Os animais devem ser identificados individualmente e permanecer nas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início do ensaio, para aclimação às condições laboratoriais.

##### **Preparação das doses**

15. Administra-se o produto químico em estudo por meio de uma sonda esofágica ou através da dieta ou da água de beber. O método de administração oral depende do objetivo do estudo, bem como das propriedades físico-químicas e toxicocinéticas do produto químico em causa.
16. Se necessário, pode suspender-se ou dissolver-se o produto químico em estudo num veículo apropriado. Recomenda-se que, sempre que possível, a primeira opção seja uma solução ou suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode optar-se por uma solução ou suspensão num óleo (por exemplo, em óleo de milho); em último caso, poderá recorrer-se a uma solução noutro veículo. Se o veículo utilizado não for água, é necessário conhecer as suas características de toxicidade. Deve determinar-se a estabilidade do produto químico em estudo no veículo utilizado.

## PROCEDIMENTO

### Número e sexo dos animais

17. Para cada dose, devem ser utilizados, pelo menos, 10 animais (cinco machos e cinco fêmeas). Se estiver prevista a realização de eutanásias intercalares, os efetivos devem ser aumentados no número de animais a eutanasiar antes da conclusão do estudo. Deve ponderar-se a constituição de um grupo satélite de dez animais (cinco de cada sexo) paralelamente ao grupo de controlo e ao grupo exposto à dose mais elevada, a fim de observar a reversibilidade, a persistência e o aparecimento diferido de efeitos tóxicos durante, pelo menos, 14 dias após o termo da exposição.

### Dosagem

18. Em geral, devem ser utilizados pelo menos três grupos de ensaio e um grupo de controlo. Porém, se, após a avaliação de outros dados, não for de prever nenhum efeito com a dose de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia, pode efetuar-se um ensaio do limite. Se não se dispuser de dados adequados para o efeito, pode efetuar-se um estudo exploratório, com animais da mesma estirpe e proveniência, para facilitar a determinação das doses a utilizar. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos ensaiados. Se for utilizado um veículo para administrar o produto químico em estudo, o grupo de controlo deve receber o volume máximo de veículo utilizado.
19. Na escolha das doses devem ser tidos em conta os dados eventualmente disponíveis sobre a toxicidade e a toxicocinética do produto químico em estudo ou de produtos afins. Deve escolher-se como dose mais elevada uma dose que induza efeitos tóxicos, mas não cause mortalidade nem sofrimento intenso. Seleciona-se a seguir uma sequência decrescente de doses que permita correlacionar as respostas observadas com as doses administradas e cuja dose mais baixa não produza nenhum efeito adverso observável (NOAEL). O intervalo ótimo entre doses consecutivas é frequentemente definido por um fator de 2 a 4. A inclusão de um quarto grupo de ensaio é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes (fatores superiores a 10) entre as dosagens.
20. Caso se observem sinais de toxicidade generalizada (por exemplo, redução do peso corporal, efeitos ao nível hepático, cardíaco, pulmonar ou renal, etc.) ou outras alterações que possam não ser reações tóxicas (por exemplo, diminuição da quantidade de alimentos ingerida, dilatação hepática, etc.), deverá interpretar-se com cautela qualquer efeito observado ao nível dos parâmetros imunológicos, neurológicos ou endócrinos.

### Ensaio do limite

21. Se o ensaio, realizado de acordo com o presente método, de uma dose não inferior a 1 000 mg/kg de peso corporal/dia ou, no caso da administração através da dieta ou da água de beber, de uma percentagem equivalente administrada através desses veículos (com base nos pesos corporais determinados) não produzir efeitos tóxicos observáveis e, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não forem de prever efeitos tóxicos, pode considerar-se que não é necessário efetuar um estudo completo com três doses. Nesses casos, justifica-se a realização de um ensaio do limite, exceto se os dados relativos à exposição humana aconselharem o ensaio de doses superiores.

### Administração das doses

22. Administra-se diariamente a dose prevista do produto químico em estudo aos animais durante 28 dias. A administração forçada por meio de uma sonda esofágica deve efetuar-se numa dose única, utilizando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal, não devendo exceder 1ml/100 g de peso corporal; excetuam-se as soluções aquosas, que podem ser administradas na proporção de 2 ml/100 g de peso corporal. Para minimizar as diferenças entre os volumes administrados, devem ser efetuados ajustes nas concentrações, de forma que o volume seja o mesmo para todas as doses; excetuam-se os ensaios de produtos químicos irritantes ou corrosivos, cujos efeitos são normalmente exacerbados a concentrações mais elevadas.
23. É importante assegurar que as quantidades do produto químico em estudo administradas através da dieta ou da água de beber não interferem na nutrição normal nem no equilíbrio hídrico. Se o produto químico em estudo for incorporado na dieta, pode optar-se por concentrações constantes nesta (ppm) ou por doses constantes em relação ao peso corporal de cada animal, devendo indicar-se a opção tomada. No caso dos produtos químicos administrados por sonda esofágica, a dose deve ser administrada todos os dias à mesma hora, devendo ser ajustada sempre que necessário para manter uma relação constante entre a dose administrada e o peso corporal do animal. Se o ensaio de toxicidade oral por dose repetida constituir uma etapa preliminar de um estudo a longo prazo, a dieta deve ser a mesma em ambos os casos.

### Exames

24. O período de observação é de 28 dias. Os animais incluídos nos grupos satélites destinados a continuarem a ser observados devem ser mantidos durante, pelo menos, mais 14 dias sem administração do produto químico em estudo, para deteção do aparecimento diferido, da persistência ou da reversibilidade de efeitos tóxicos.
25. Pelo menos uma vez por dia, deve efetuar-se um exame clínico geral, de preferência sempre à(s) mesma(s) hora(s) e tendo em conta o período previsto de efeitos mais acentuados após a administração do produto químico em estudo, registando o estado de saúde dos animais. Pelo menos duas vezes por dia, verificam-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais.

26. Deve efetuar-se um exame clínico aprofundado a cada animal antes da primeira exposição (para poder fazer depois comparações com o estado inicial do animal) e, posteriormente, pelo menos uma vez por semana. Estes exames devem ser realizados fora das gaiolas, num recinto normalizado, de preferência sempre à mesma hora. Os resultados destes exames devem ser cuidadosamente registados, de preferência por recurso a um sistema de pontuação claramente definido pelo laboratório em causa. Deve zelar-se por que as condições de ensaio sejam o mais constantes possível e os exames devem ser efetuados, de preferência, por pessoal que não esteja a par do ensaio realizado. Entre os sinais a registar contam-se alterações da pele, da pelagem, dos olhos e das mucosas e a ocorrência de secreções, excreções ou reações neurovegetativas (por exemplo, lacrimação, horripilação, alterações da dimensão pupilar ou respiração anormal). Deve também registar-se qualquer alteração da maneira de o animal se mover, da postura e da reação à manipulação, bem como a ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e de comportamentos estereotipados (por exemplo, atos de higiene repetitivos ou movimentação repetitiva em círculo) ou estranhos (automutilação, movimentação para trás, etc.) (2).
27. Na quarta semana de exposição deve determinar-se a reação sensorial a diversos tipos de estímulos (2) (nomeadamente auditivos, visuais e propriocetivos) (3)(4)(5) e avaliar-se a força de preensão (6) e a atividade motora (7). As referências indicadas contêm mais informações sobre a maneira de proceder em cada caso, embora possam adotar-se procedimentos distintos dos nelas descritos.
28. Se o estudo constituir uma etapa preliminar de um estudo ulterior de toxicidade subcrónica (a 90 dias), podem ser omitidos os exames funcionais previstos para a quarta semana. Nesse caso, os exames funcionais devem realizar-se durante o estudo subsequente. Não obstante, os dados de exames funcionais realizados durante o estudo por dose repetida podem facilitar a escolha das doses a utilizar no estudo ulterior de toxicidade subcrónica.
29. Como segunda exceção, também podem omitir-se os exames funcionais no caso dos grupos de animais que apresentem sinais de toxicidade cuja intensidade interferiria de modo significativo com esses exames.
30. Na autópsia, pode determinar-se (facultativamente) a fase do ciclo estral de cada fêmea por meio de um esfregaço vaginal. Este exame fornece informações sobre a fase do ciclo estral no momento da eutanásia do animal e facilita a avaliação histológica dos tecidos sensíveis aos estrogénios – ver as orientações sobre histopatologia (19).

#### **Peso corporal e consumo de alimentos e de água**

31. Todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana. O consumo de alimentos deve ser medido pelo menos uma vez por semana. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, o consumo de água também deve medir-se pelo menos uma vez por semana.

#### **Hematologia**

32. No final do período de ensaio, devem determinar-se os seguintes parâmetros hematológicos: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, reticulócitos, contagem total de leucócitos e fórmula leucocitária, contagem de plaquetas e tempo e potencial de coagulação. Caso o produto químico em estudo ou os seus metabolitos potenciais tenham, ou se suspeite que tenham, propriedades oxidantes, devem ser efetuadas outras análises, nomeadamente a determinação da concentração de meta-hemoglobina e de corpos de Heinz.
33. As colheitas de sangue devem ser efetuadas num ponto determinado a indicar, imediatamente antes da eutanásia dos animais ou integradas nesta, e as amostras devem ser armazenadas em condições adequadas. Os animais devem jejuar na noite anterior à eutanásia <sup>(1)</sup>.

#### **Bioquímica clínica**

34. Recorrendo a amostras de sangue de cada animal, colhidas imediatamente antes da eutanásia ou durante esta (com exceção dos animais moribundos e/ou eutanasiados antes do termo do estudo), devem ser efetuadas determinações bioquímicas clínicas destinadas a investigar os principais efeitos tóxicos nos tecidos, nomeadamente aos níveis renal e hepático. Os parâmetros a determinar no plasma ou no soro são os seguintes: sódio, potássio, glucose, colesterol total, ureia, creatinina, proteínas totais e albumina, pelo menos duas enzimas indicadoras de efeitos hepatocelulares (tais como a alanina-aminotransferase, a aspartato-aminotransferase, a fosfatase alcalina, a gama-glutamil-transpeptidase e a glutamato-desidrogenase) e os ácidos biliares. Em determinados casos, a determinação de outras enzimas (de origem hepática ou outra origem) e da bilirrubina pode fornecer informações úteis.
35. A título facultativo, podem realizar-se na última semana do estudo as seguintes determinações na urina, utilizando amostras recolhida em momentos determinados: aspeto, volume, osmolaridade ou densidade, pH, proteínas, glucose e sangue/hematócitos.

<sup>(1)</sup> No caso de algumas determinações no soro e no plasma, nomeadamente da glucose, é aconselhável que os animais jejuem durante a noite. O principal motivo desta recomendação reside no facto de que a maior variabilidade dos resultados que inevitavelmente ocorreria se os animais não jejuassem poderia ocultar efeitos subtis e dificultar as interpretações. No entanto, por outro lado, o jejum durante a noite pode interferir no metabolismo geral dos animais e, particularmente nos estudos realizados com administração pela via alimentar, perturbar a exposição diária ao produto químico em estudo. Caso se opte pelo jejum durante a noite, as análises bioquímicas devem ser efetuadas após os exames funcionais previstos para a quarta semana do estudo.

36. Deve ainda prever-se a pesquisa no plasma ou no soro de marcadores de lesões gerais dos tecidos. Caso as propriedades conhecidas do produto químico em estudo afetem, ou se suspeite de que possam afetar, determinadas vias metabólicas, devem realizar-se outras determinações, nomeadamente as seguintes: cálcio, fosfatos, triglicéridos, hormonas específicas e colinesterase. A necessidade de efetuar estas determinações é estabelecida para certas classes de produtos químicos ou é avaliada para cada caso concreto.
37. Embora na avaliação internacional dos parâmetros endócrinos não tenha ficado demonstrado ser claramente vantajoso determinar as hormonas tiroideias (T3 e T4) e a TSH, pode ser útil conservar amostras de plasma ou de soro para determinar (facultativamente) a T3, a T4 e a TSH, caso surjam indícios de efeitos no eixo hipofisotiroideio. Estas amostras podem ser congeladas a -20 °C para serem armazenadas. Os fatores a seguir indicados podem afetar a variabilidade dos resultados das análises hormonais e as concentrações absolutas nelas determinadas:
- momento da eutanásia, devido à variação das concentrações hormonais ao longo do dia,
  - método utilizado para eutanasiar os animais sem lhes causar tensões desnecessárias, que poderiam afetar as concentrações hormonais,
  - diferenças ao nível das curvas de calibração dos conjuntos (*kits*) para as determinações hormonais.
- É mais fiável recorrer a uma análise histopatológica do que à determinação de níveis harmonias para identificar inequivocamente os produtos químicos com atividade na tiroide.
38. As amostras de plasma especificamente destinadas a determinações hormonais devem colher-se à mesma hora do dia. Recomenda-se que se pondere a realização das análises da T3, da T4 e da TSH com base nas alterações histopatológicas detetadas na tiroide. Os conjuntos (*kits*) existentes no comércio para determinar concentrações hormonais podem dar valores diferentes. Pode, portanto, não ser possível estabelecer critérios de desempenho baseados em dados históricos homogéneos. Em alternativa, os laboratórios devem procurar manter os coeficientes de variação para efeitos de controlo abaixo de 25, no caso dos parâmetros T3 e T4, e abaixo de 35, no caso do parâmetro TSH. As concentrações devem ser registadas em ng/ml.
39. Se os dados históricos de base forem inadequados, deve ponderar-se a determinação da variabilidade dos parâmetros hematológicos e de bioquímica clínica antes de iniciar a exposição dos animais às doses previstas ou – o que será preferível – num conjunto de animais não incluídos nos grupos ensaiados.

#### PATOLOGIA

##### **Autópsia macroscópica**

40. Deve ser realizada a todos os animais estudados uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Removem-se convenientemente os tecidos aderentes ao fígado, aos rins, às glândulas suprarrenais, aos testículos, aos epidídimos, ao conjunto formado pela próstata, pelas vesículas seminais e pelas glândulas coagulantes, ao timo, ao baço, ao encéfalo e ao coração de todos os animais (exceto os moribundos e os que sejam eutanasiados antes do termo do estudo) e pesa-se cada um destes ainda húmido o mais rapidamente possível depois da dissecação, para evitar que seque. Ao remover os tecidos aderentes ao complexo prostático, há que tomar precauções para não perfurar as vesículas seminais, que têm líquido no interior. Em alternativa, podem remover-se os tecidos aderentes à próstata e às vesículas seminais e efetuar a pesagem depois de fixar estes órgãos.
41. A título facultativo, podem pesar-se dois outros tecidos – para evitar que sequem, também o mais rapidamente possível depois da dissecação: os dois ovários (ainda húmidos) e o útero, incluindo o colo do útero – o documento TG 440 da OCDE (18) contém orientações sobre a dissecação e a preparação dos tecidos uterinos para a pesagem].
42. A pesagem (facultativa) da tiroide deve realizar-se após fixação. A remoção dos tecidos aderentes à tiroide deve efetuar-se com muito cuidado e também só depois da fixação, para evitar danificar tecidos – que, a ocorrer, poderia comprometer a análise histopatológica.
43. Os tecidos a seguir indicados devem conservar-se no meio de fixação mais adequado ao tipo de tecido e ao exame histopatológico previsto (ver o ponto 47): todas as lesões macroscópicas, o encéfalo (regiões representativas, incluindo os hemisférios cerebrais, o cerebelo e a protuberância anelar), a medula espinal, os olhos, o estômago, o intestino delgado e o intestino grosso (incluindo as placas de Peyer), o fígado, os rins, as glândulas suprarrenais, o baço, o coração, o timo, a tiroide, a traqueia e os pulmões (conservados por injeção de fixador, seguida de imersão), as gónadas (testículos e ovários), os órgãos sexuais secundários (útero e colo do útero, epidídimos, próstata + vesículas seminais e glândulas de coagulação), a vagina, a bexiga urinária, os gânglios linfáticos – o gânglio linfático mais próximo e outro gânglio linfático, a selecionar em função da experiência anterior do laboratório (15) –, um nervo periférico (ciático ou tibial), de preferência na vizinhança do músculo, músculo esquelético e osso com medula óssea (corte ou, em alternativa, uma punção recente de medula óssea). Recomenda-se a fixação dos testículos por imersão em fixador de Bouin ou em fixador de Davidson modificado (16)(17). Para que o fixador penetre rapidamente, deve puncionar-se superficialmente a túnica albugínea com uma agulha, com cuidado, em ambos os polos do órgão. Os resultados clínicos e outros podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem conservar-se também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indicem que serão provavelmente afetados.

44. Os seguintes tecidos podem dar indicações úteis sobre efeitos ao nível do sistema endócrino: gónadas (ovários e testículos), órgãos sexuais secundários (útero, incluindo o colo do útero, epidídimos, vesículas seminais e glândulas de coagulação, bem como a próstata dorsolateral e ventral), vagina, hipófise, glândulas mamárias masculinas, tiroide e glândulas suprarrenais. Não há documentação suficiente de alterações das glândulas mamárias masculinas, mas este parâmetro pode ser muito sensível às substâncias com atividade estrogénica. A observação dos órgãos e tecidos não especificados no ponto 43 é facultativa (ver o apêndice 2).
45. O documento com a referência 19, que contém orientações no domínio da histopatologia, dá mais informações sobre a dissecação, a fixação, a colheita de amostras e a histopatologia de tecidos do sistema endócrino.
46. No programa de ensaios internacional obtiveram-se alguns indícios de que é possível detetar efeitos endócrinos subtis de produtos químicos capazes de afetar ligeiramente a homeostase das hormonas sexuais, não tanto com base em alterações histopatológicas claras dos órgãos sexuais femininos, mas sim através das perturbações que aqueles provocam na sincronização do ciclo estral em diversos tecidos. Embora esses efeitos careçam de prova definitiva, recomenda-se que, na interpretação do exame histopatológico dos ovários (células foliculares, tecais e da granulosa), do útero, do colo do útero e da vagina, se tenham em conta eventuais indícios de assincronias do ciclo estral. Caso se determine o estágio do ciclo por meio de esfregaços vaginais, este dado pode ser tido em conta como elemento comparativo suplementar.

#### **Histopatologia**

47. Deve efetuar-se um exame histopatológico completo dos órgãos e tecidos conservados de todos os animais dos grupos de controlo e do grupo que recebeu a dose mais elevada. Caso o exame dos animais deste último grupo revele alterações atribuíveis à dose do produto químico em estudo, devem examinar-se também os animais de todos os outros grupos a que foram administradas doses do produto químico.
48. Devem examinar-se todas as lesões macroscópicas.
49. Caso se tenha constituído um grupo satélite de animais, deve efetuar-se o exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos grupos expostos a uma dose do produto químico em estudo.

#### **DADOS E RELATÓRIOS**

##### **Dados**

50. Devem ser apresentados todos os dados individuais. Os dados devem ainda ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais no início do ensaio, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados, a hora de cada morte ou eutanásia, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, os sinais de toxicidade observados, nomeadamente o momento do seu aparecimento e a sua duração e intensidade, o número de animais que apresentaram lesões, o tipo e a intensidade destas e a percentagem de animais que apresentaram cada tipo de lesão.
51. Se possível, devem ser avaliados os resultados numéricos por um método estatístico corrente adequado. Na comparação de um efeito numa gama de doses, deve evitar-se o recurso a múltiplos testes t. Os métodos estatísticos devem ser escolhidos no planeamento do estudo.
52. Para fins de controlo de qualidade, propõe-se a compilação de dados de controlo históricos e o cálculo de coeficientes de variação dos dados numéricos, especialmente no caso dos parâmetros relacionados com a deteção de desreguladores do sistema endócrino. Estes dados podem ser utilizados para fins comparativos quando da avaliação de estudos reais.

##### **Relatório dos ensaios**

53. Elementos a constar do relatório dos ensaios:

*Produto químico em estudo:*

- natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas,
- dados de identificação.

*Veículo (se for o caso):*

- justificação da escolha do veículo (se não for água).

*Animais estudados:*

- espécie e estirpe utilizadas,
- número, idade e sexo,
- proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.,
- peso de cada animal no início do ensaio,
- caso não sejam utilizados ratos, justificação da utilização de outra espécie.

*Condições de realização dos ensaios:*

- fundamentação da escolha das doses,
- elementos relativos à formulação do produto químico em estudo/à incorporação do mesmo na dieta dos animais; concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação,
- elementos relativos à administração do produto químico em estudo,
- se aplicável, equivalência entre a concentração do produto químico em estudo na dieta ou na água de beber, expressa em ppm, e a dose real, expressa em mg/kg de peso corporal/dia,
- elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água.

*Parâmetros facultativos examinados:*

- lista desses parâmetros.

*Resultados:*

- pesos corporais e alterações de peso corporal,
- consumo de alimentos e de água, se aplicável,
- respostas tóxicas em função do sexo e da dose administrada, incluindo sinais de toxicidade,
- natureza, intensidade e duração dos sinais clínicos observados (reversíveis ou irreversíveis),
- dados relativos à atividade sensorial, à força de prensão e à atividade motora,
- resultados das análises hematológicas, acompanhados dos respetivos valores de base,
- resultados das análises bioquímicas, acompanhados dos respetivos valores de base,
- pesos corporais no momento da eutanásia e pesos dos órgãos,
- resultados das autópsias,
- descrição pormenorizada dos resultados do exame histopatológico,
- dados de absorção, se disponíveis,
- tratamento estatístico dos resultados, se for o caso.

*Discussão dos resultados.**Conclusões.*

---



## Apêndice 1

## DEFINIÇÕES

**Atividade antiandrogénica:** capacidade de um produto químico de agir como hormona androgénica natural (por exemplo, a testosterona) num mamífero.

**Atividade antiandrogénica:** capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona androgénica natural (por exemplo, a testosterona) num mamífero.

**Atividade antiestrogénica:** capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona estrogénica natural (por exemplo, o estradiol 17 $\beta$ ) num mamífero.

**Atividade antitiroideia:** capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona da tiroide natural (por exemplo, a T<sub>3</sub>) num mamífero.

**Dosagem:** termo geral que abrange a dose, a frequência desta e o tempo de aplicação da mesma.

**Dose:** quantidade de produto químico em estudo administrada. Exprime-se em peso diário do produto químico por unidade de peso corporal do animal ensaiado (por exemplo, mg/kg de peso corporal/dia) ou sob a forma de uma concentração constante na dieta.

**Toxicidade evidente:** termo geral que descreve a existência de sinais claros de toxicidade após a administração do produto químico em estudo. Os sinais em causa devem ser suficientes para a avaliação dos perigos e devem ser tais que seja de prever que o aumento da dose administrada provoque o aparecimento de sinais intensos de toxicidade e provável mortalidade.

**NOAEL:** abreviatura de "*no observed adverse effect level*" ("nível sem observação de efeitos adversos"), que constitui a dose máxima que não produz efeitos adversos observáveis da exposição à mesma.

**Atividade estrogénica:** capacidade de um produto químico de agir como hormona estrogénica natural (por exemplo, o estradiol 17 $\beta$ ) num mamífero.

**Produto químico em estudo:** qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

**Atividade tiroideia:** capacidade de um produto químico de agir como uma hormona da tiroide natural (por exemplo, a T<sub>3</sub>) num mamífero.

**Validação:** processo científico concebido para caracterizar as limitações e os imperativos operacionais de um método de ensaio e para demonstrar a fiabilidade e pertinência do mesmo para um determinado fim.

---

## Apêndice 2

## Parâmetros recomendados para a deteção de desreguladores do sistema endócrino pelo método B.7

Parâmetros obrigatórios	Parâmetros facultativos
Peso	
<ul style="list-style-type: none"> <li>— Testículos</li> <li>— Epidídimos</li> <li>— Glândulas suprarrenais</li> <li>— Próstata + vesículas seminais e glândulas coagulantes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Ovários</li> <li>— Útero, incluindo o colo do útero</li> <li>— Tireoide</li> </ul>
Histopatologia	
<ul style="list-style-type: none"> <li>— Gónadas <ul style="list-style-type: none"> <li>— Testículos e</li> <li>— Ovários</li> </ul> </li> <li>— Órgãos sexuais secundários: <ul style="list-style-type: none"> <li>— Epidídimos</li> <li>— Próstata + vesículas seminais e glândulas coagulantes</li> <li>— Útero, incluindo o colo do útero</li> </ul> </li> <li>— Glândulas suprarrenais</li> <li>— Tireoide</li> <li>— Vagina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Esfregaço vaginal</li> <li>— Glândulas mamárias masculinas</li> <li>— Hipófise</li> </ul>
Dosagens hormonais	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Níveis circulantes de T3 e T4</li> <li>— Níveis circulantes de TSH</li> </ul>

## REFERÊNCIAS:

- (1) OCDE (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the *ad hoc* Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.
- (2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (3) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40:999-1003.
- (4) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol Environ. Health* 9:691-704.
- (5) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108:267-283.
- (6) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1:233-236.
- (7) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13:599-609.
- (8) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10-11 de março de 1998. ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (9) OCDE (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No. 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

- (10) OCDE (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No. 21, ENV/JM/MONO(2002)8.
- (11) OCDE (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. [http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr\\_2649\\_37407\\_2348794\\_1\\_1\\_1\\_37407,00.html](http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html).
- (12) OCDE (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.
- (13) OCDE. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.
- (14) OCDE (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (15) Haley P., Perry R., Ennulat D., Frame S., Johnson C., Lapointe J.-M., Nyska A., Snyder P.W., Walker D., Walter G. (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. *Toxicol Pathol.* 33:404-407.
- (16) Hess R.A., Moore B.J. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin R.E. e Heindel J.J. (eds.). Academic Press, San Diego, CA, p. 52-85.
- (17) Latendresse J.R., Warbritton A.R., Jonassen H., Creasy D.M. (2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30:524-533.
- (18) OCDE (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N.º 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.
- (19) OCDE (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. ENV/JM/Mono(2009)11.

## B.8. TOXICIDADE SUBAGUDA POR INALAÇÃO: ESTUDO DE 28 DIAS

### RESUMO

Este método revisto visa caracterizar integralmente a toxicidade por via inalatória do produto químico estudado, após exposição repetida por um período limitado (28 dias), e obter dados para quantificar os riscos por inalação. Expõem-se durante 28 dias, seis horas por dia, grupos constituídos por dez roedores machos e dez roedores fêmeas a três ou mais concentrações do produto químico em estudo (a), a ar filtrado (b, controlo negativo), e/ou ao veículo (c, controlo do veículo). Em geral, Os animais são expostos durante cinco dias por semana, mas admite-se que sejam expostos sete dias por semana. Ensaiam-se sempre machos e fêmeas, mas cada sexo pode ser exposto a concentrações diferentes, se um deles for reconhecidamente mais sensível ao produto químico do que o outro. Este método concede ao diretor do estudo flexibilidade suficiente para incluir grupos satélites (para apreciação da reversibilidade), lavagens broncoalveolares, testes neurológicos e exames histopatológicos e de patologia clínica suplementares, a fim de melhor caracterizar a toxicidade do produto químico em estudo.

### INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 412 (2009) da OCDE. O *Test Guideline* 412 (TG 412) inicial relativo à toxicidade subaguda por inalação foi adotado em 1981 (1). O presente método B.8 é equivalente ao método TG 412 revisto, tendo sido atualizado para refletir o estado da ciência e cumprir exigências atuais e futuras da regulamentação.
2. O método permite caracterizar os efeitos adversos resultantes da exposição diária por inalação, durante 28 dias, ao produto químico em estudo. Os dados gerados pelos estudos de toxicidade subaguda por inalação durante 28 dias podem ser utilizados para quantificar riscos (caso não se lhes siga um estudo de toxicidade subcrónica por inalação a 90 dias — capítulo B.29 deste anexo). Os dados gerados pelo presente método também podem ser úteis para a escolha das concentrações a utilizar em estudos mais prolongados, por exemplo, o estudo da toxicidade subcrónica por inalação a 90 dias. O método não se destina especificamente ao ensaio de nanomateriais. No final do capítulo e no documento de orientações n.º 39 (2) são definidos alguns conceitos utilizados neste método.

#### CONSIDERAÇÕES INICIAIS

3. A fim de melhorar a qualidade do estudo e de minimizar a utilização de animais, antes de realizar o estudo o laboratório de ensaios deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa. Entre os elementos úteis para a escolha das concentrações mais adequadas contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, resultados de ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana, dados (Q)SAR — "(quantitative) structure-activity relationships", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins e dados provenientes de ensaios de toxicidade aguda por inalação. Se estiver prevista a ocorrência ou ocorrerem manifestações de neurotoxicidade durante o estudo, fica ao critério do diretor deste incluir no estudo as avaliações suplementares que considere adequadas, tais como uma bateria de observações funcionais e determinações da atividade motora. Embora o momento da exposição possa ser um aspeto crítico em determinados exames, a realização destes estudos suplementares não deve interferir na conceção do estudo principal.
4. No caso dos produtos químicos corrosivos ou irritantes, podem ser ensaiadas diluições adequadas, a concentrações que gerem o grau de toxicidade pretendido [ver o GD 39 (2)]. Ao expor animais a produtos químicos com tais características, as concentrações visadas devem ser suficientemente baixas para não causarem dor ou sofrimento intensos, sem deixarem de ser suficientes para que a curva de resposta à concentração abranja os níveis correspondentes aos objetivos do ensaio, nos planos científico e da regulamentação. Estas concentrações devem ser adaptadas a cada caso, de preferência com base num estudo exploratório convenientemente concebido, que forneça informações sobre o parâmetro crítico, eventuais limiares de irritação e o momento do aparecimento dos efeitos (ver os pontos 11 a 13). É necessário justificar as concentrações escolhidas em cada caso.
5. Os animais moribundos ou que apresentem sinais óbvios de dor ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados. Os animais moribundos são equiparados aos que morrem durante o ensaio. O documento de orientações da OCDE relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (3) define os critérios que devem presidir à decisão de eutanasiar animais moribundos ou em grande sofrimento, bem como orientações sobre o reconhecimento da morte previsível ou iminente.

#### DESCRIÇÃO DO MÉTODO

##### **Escolha da espécie animal**

6. Devem ser utilizados roedores adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais de uso corrente. A espécie preferida é o rato. É necessário justificar o recurso a outras espécies.

##### **Preparação dos animais**

7. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas. No dia da seleção aleatória, os animais devem ser adultos jovens com sete a nove semanas, de peso corporal não desviado mais de 20 % do peso médio correspondente a cada sexo. Os animais são selecionados aleatoriamente, marcados para identificação individual e mantidos nas suas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início do ensaio, para aclimação às condições laboratoriais.

##### **Manutenção dos animais**

8. É necessário identificar individualmente cada animal, se possível com um respondedor (*transponder*) subcutâneo, para facilitar as observações e evitar confusões. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. O ideal será manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, embora isto possa não ser possível ao utilizar água como veículo. Antes e depois das exposições, os animais são geralmente engaiolados por sexo e por concentração, mas o número de animais por gaiola não deve dificultar a clara observação de cada animal e deve minimizar as perdas devidas a lutas ou canibalismo. Quando se opta pela exposição unicamente nasal dos animais, pode ser necessário aclimatá-los aos tubos de contenção. Estes não devem provocar aos animais tensões físicas, térmicas ou dinâmicas excessivas. A contenção dos animais pode afetar parâmetros fisiológicos como a temperatura corporal (hipertermia) e/ou o volume respirado por minuto. Caso se disponha de dados genéricos reveladores de que nenhuma destas alterações ocorre em grau apreciável, não será necessária a adaptação prévia aos tubos de contenção. Os animais cujo corpo seja exposto na totalidade a um aerossol devem permanecer em gaiolas individuais durante a exposição, para evitar que o aerossol seja filtrado pela pelagem dos que com eles coabitem. Exceto nos períodos de exposição, podem utilizar-se dietas convencionais certificadas de laboratório, com fornecimento ilimitado de água potável da rede pública. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão.

##### **Câmaras de inalação**

9. Ao escolher-se a câmara de inalação, deve ter-se em conta a natureza do produto químico em estudo e o objetivo do ensaio. Privilegia-se o modo de exposição unicamente nasal, termo que abrange as exposições "unicamente da cabeça", "unicamente do nariz" e "unicamente do focinho". A exposição unicamente nasal é geralmente preferida no estudo de aerossóis de líquidos ou de sólidos, ou de vapores que possam condensar-se e formar aerossóis. Para determinados objetivos do estudo, poderá ser melhor recorrer ao modo de exposição de corpo inteiro, mas será necessário justificá-lo no relatório. Para garantir estabilidade atmosférica nas câmaras de corpo inteiro, o volume de todos os animais presentes em cada câmara não deve exceder 5 % do volume da câmara. O documento GD 39 (2) descreve os princípios, vantagens e desvantagens das técnicas de exposição unicamente nasal e de corpo inteiro.

## ESTUDOS DA TOXICIDADE

**Concentrações-limite**

10. Contrariamente aos estudos de toxicidade aguda, nos estudos de toxicidade subaguda por inalação a 28 dias não está definida nenhuma concentração-limite. Na escolha da concentração máxima a ensaiar, deve ter-se em conta a concentração máxima atingível, o nível de exposição humana mais desfavorável, a necessidade de manter um fornecimento adequado de oxigénio e/ou considerações de bem-estar animal. Se os dados disponíveis não permitirem estabelecer limites, podem utilizar-se os valores-limite de exposição aguda fixados no Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (13) – concentração máxima até 5 mg/l para aerossóis, 20 mg/l para vapores e 20 000 ppm para gases; ver igualmente o GD 39 (2). Se for necessário exceder estes limites ao ensaiar gases ou produtos químicos muito voláteis (por exemplo, refrigerantes), haverá que justificá-lo. A concentração-limite deve induzir efeitos tóxicos inequívocos sem gerar tensões desnecessárias nos animais nem afetar a longevidade dos mesmos (3).

**Estudo exploratório**

11. Antes de iniciar o estudo principal, pode ser necessário realizar um estudo exploratório. Um estudo exploratório com as características aqui definidas é mais completo do que um estudo preliminar, por não se limitar à escolha das concentrações. O êxito do estudo principal pode depender dos conhecimentos adquiridos num estudo exploratório. Este pode, por exemplo, fornecer informações técnicas sobre métodos de análise, granulometria, mecanismos de toxicidade, dados histopatológicos e de patologia clínica e estimativas do nível sem observação de efeitos adversos (NOAEL) e da concentração máxima tolerada no estudo principal. Fica ao critério do diretor do estudo recorrer a um estudo exploratório para determinar o limite mínimo de irritação do aparelho respiratório (por exemplo, por meio de uma histopatologia do aparelho respiratório, de testes da função pulmonar ou de uma lavagem broncoalveolar), a concentração máxima que os animais toleram sem tensões excessivas e os parâmetros que melhor caracterizam a toxicidade do produto químico em estudo.
12. O estudo exploratório pode abranger uma ou mais concentrações. A cada concentração, expõem-se, no máximo, três machos e três fêmeas. A duração deste estudo varia entrecinco dias, no mínimo, e geralmente não mais de 14 dias. É necessário justificar no relatório as concentrações escolhidas para o estudo principal. O objetivo deste último é demonstrar a existência de uma relação entre a concentração e a resposta obtida para o parâmetro previsivelmente mais sensível. Idealmente, a concentração mais baixa deve ser a concentração sem efeitos adversos observáveis e a concentração mais alta deve induzir efeitos tóxicos inequívocos, sem gerar tensões desnecessárias nos animais nem afetar a longevidade dos mesmos (3).
13. Ao escolher os níveis de concentração para o estudo exploratório, devem ponderar-se todas as informações disponíveis, incluindo relações estrutura-atividade e dados relativos a produtos químicos semelhantes (ver o ponto 3). O estudo exploratório pode confirmar ou refutar a escolha dos parâmetros mais sensíveis segundo critérios mecanísticos, por exemplo, a inibição da colinesterase por organofosfatos, a formação de meta-hemoglobina por agentes eritrocitotóxicos, as hormonas tiroideias ( $T_3$  e  $T_4$ ), no caso dos agentes tiorotóxicos, proteínas, a LDH, ou a presença de neutrófilos na lavagem broncoalveolar, no caso de partículas inócuas fracamente solúveis ou de aerossóis irritantes dos pulmões.

**Estudo principal**

14. Um estudo principal de toxicidade subaguda compreende geralmente três níveis de concentração, bem como, em paralelo, os controlos negativo (do ar) e/ou do veículo (ver o ponto 17). Para facilitar a seleção dos níveis de exposição, devem ser utilizados todos os dados disponíveis, nomeadamente resultados de estudos de toxicidade sistémica, metabólicos e cinéticos (deve ter-se especial cuidado em evitar níveis de concentração elevados que saturam os processos cinéticos). Cada grupo de ensaio compreende, pelo menos, a exposição de dez roedores (cinco machos e cinco fêmeas) ao produto químico em estudo, durante seis horas por dia e cinco dias por semana, ao longo de quatro semanas (a duração total do estudo é de 28 dias). Os animais também podem ser expostos sete dias por semana (por exemplo, ao ensaiar produtos farmacêuticos inalados). Se um dos sexos for reconhecidamente mais sensível ao produto químico em estudo, pode expor-se cada sexo a concentrações diferentes das utilizadas para o outro, a fim de otimizar a resposta à concentração como se refere no ponto 15. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Se a duração da exposição for inferior a seis horas por dia ou se for necessário realizar um estudo de exposição de longa duração (por exemplo, 22 horas por dia) de corpo inteiro [ver o GD 39 (2)], será necessário justificá-lo. Durante o período de exposição, a alimentação deve ser suspensa, exceto se a exposição exceder seis horas. Durante as exposições de corpo inteiro pode continuar a fornecer-se água.
15. As concentrações visadas escolhidas devem permitir identificar o(s) órgão(s)-alvo e evidenciar uma relação clara entre a concentração e a resposta obtida:
- o nível de concentração mais elevado deve gerar efeitos tóxicos, mas não causar sintomas deletérios nem mortalidade, que impediriam a interpretação dos resultados,
  - o espaçamento do nível ou níveis de concentração intermédios deve permitir uma gradação dos efeitos tóxicos entre os correspondentes aos das concentrações mais baixa e mais elevada,
  - o nível de concentração mais baixo não deve ter efeitos tóxicos ou, se os tiver, estes devem ser reduzidos.

**Estudo em grupos satélites (para apreciação da reversibilidade)**

16. Pode recorrer-se a um estudo satélite para observar a reversibilidade, a persistência ou o aparecimento diferido de efeitos tóxicos durante um período adequado, não inferior a 14 dias, após o termo da exposição. Compõem os grupos satélites cinco machos e cinco fêmeas, que são expostos ao mesmo tempo que os animais ensaiados no estudo principal. Os animais dos grupos satélites são expostos à concentração mais elevada do produto químico em estudo e devem ser complementados pelos grupos necessários de controlo do ar e/ou do veículo em paralelo (ver o ponto 17).

**Animais de controlo**

17. Os animais de controlo negativo (do ar) em paralelo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos que participam no ensaio principal, exceto que são expostos a ar filtrado em vez de ao produto químico em estudo. Se for utilizada água ou outra substância para gerar a atmosfera ensaiada, deve incluir-se no estudo, em vez do grupo de controlo negativo (do ar), um grupo de controlo do veículo. Sempre que possível, o veículo utilizado deve ser água. Se assim for, os animais de controlo são expostos a ar com a mesma humidade relativa que o ar utilizado para os grupos expostos ao produto químico em estudo. A escolha do veículo mais adequado deve basear-se em dados históricos ou num estudo prévio convenientemente realizado. Se não se conhecer bem a toxicidade do veículo, fica ao critério do diretor do estudo utilizar em simultâneo um controlo negativo (do ar) e um controlo do veículo, embora se desaconselhe fortemente este procedimento. Se os dados históricos revelarem que o veículo não é tóxico, não haverá necessidade de um grupo de controlo negativo (do ar) e apenas deve utilizar-se um controlo do veículo. Se um estudo prévio de um produto químico incorporado num determinado veículo não revelar toxicidade, conclui-se que o veículo em causa não é tóxico à concentração ensaiada, devendo utilizar-se esse controlo do veículo.

**CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO****Administração das concentrações**

18. Os animais são expostos ao produto químico em estudo sob a forma de gás, vapor, aerossol ou de uma mistura destes. O estado físico a ensaiar depende das propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, da concentração escolhida e/ou da forma física cuja probabilidade de presença durante a manipulação e utilização do mesmo seja maior. Os produtos químicos higroscópicos ou quimicamente reativos devem ser ensaiados em atmosfera seca. Devem tomar-se precauções para evitar concentrações que possam provocar explosões. As matérias em partículas podem ser sujeitas a processos mecânicos para reduzir a granulometria. Para mais orientações, consultar o documento GD 39 (2).

**Distribuição granulométrica**

19. Os aerossóis e os vapores que possam condensar-se em aerossóis devem ser objeto de análise granulométrica. Para que todas as zonas pertinentes do aparelho respiratório sejam expostas, recomenda-se a utilização de aerossóis com diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) compreendido entre 1 µm e 3 µm e desvio-padrão geométrico ( $\sigma_g$ ) compreendido entre 1,5 e 3,0 (4). Deve fazer-se o razoavelmente possível para respeitar estas condições, sendo necessário um parecer especializado caso isso não se consiga. Por exemplo, as partículas dos fumos metálicos podem ser mais pequenas do que o limite inferior indicado, ao passo que as partículas carregadas e as fibras podem exceder o limite superior.

**Incorporação do produto químico em estudo num veículo**

20. Idealmente, o produto químico em estudo deve ser ensaiado sem que tenha sido incorporado num veículo. Se for necessário utilizar um veículo para obter a concentração e a granulometria adequadas do produto químico em causa, deve preferir-se a água. Se o produto químico for dissolvido num veículo, será necessário comprovar que se mantém estável.

**MONITORIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO****Caudal de ar nas câmaras**

21. Durante cada exposição, é necessário regular cuidadosamente, monitorizar continuamente e registar pelo menos de hora a hora o caudal de ar através de cada câmara. A monitorização em tempo real da concentração (ou estabilidade no tempo) da atmosfera em estudo constitui uma medida permanente de todos os parâmetros dinâmicos e um meio indireto de regular os que têm importância para a inalação. Se a concentração for monitorizada em tempo real, pode reduzir-se a frequência da medição do caudal de ar a apenas uma medição diária por exposição. É necessário ter especial cuidado em evitar reinalações nas câmaras de exposição unicamente nasal. A concentração de oxigénio não deve ser inferior a 19 % e a concentração de dióxido de carbono não deve exceder 1 %. Se houver razões para crer que estas concentrações não são respeitadas, é necessário medi-las. Se as medições efetuadas no primeiro dia de exposição mostrarem que as concentrações destes gases estão aos níveis corretos, não é necessário voltar a medi-las.

**Temperatura e humidade relativa nas câmaras**

22. Deve manter-se a temperatura nas câmaras a 22 °C ± 3 °C. Tanto no caso das exposições unicamente nasais como das exposições do corpo inteiro, é necessário monitorizar continuamente a humidade relativa na zona de respiração dos animais e, se possível, registá-la de hora a hora durante cada exposição. É preferível manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, mas isso pode não ser possível (por exemplo, quando se estudam misturas aquosas) ou pode não ser mensurável (devido a interferências do produto químico em estudo com o método de ensaio).

### Concentração nominal do produto químico em estudo

23. Sempre que possível, deve calcular-se e registar-se a concentração nominal na câmara de exposição. Esta é dada pela divisão da massa gerada do produto químico em estudo pelo volume de ar total que circulou pelo sistema da câmara de inalação. A concentração nominal não é utilizada para caracterizar a exposição dos animais, mas a sua comparação com a concentração real dá uma indicação da eficácia de geração do sistema de ensaio, podendo ser utilizada para detetar problemas a esse nível.

### Concentração real do produto químico em estudo

24. Entende-se por "concentração real do produto químico em estudo", a concentração do produto químico nas amostras colhidas na zona de respiração dos animais da câmara de inalação. As concentrações reais podem determinar-se por métodos específicos (por exemplo, amostragem direta ou métodos de adsorção ou de reação química e posterior caracterização analítica) ou por métodos inespecíficos, tais como gravimetria após filtração. O método gravimétrico só é aceitável para aerossóis de pós com um único componente ou de líquidos pouco voláteis e deve apoiar-se em caracterizações adequadas específicas do produto químico em causa efetuadas antes da realização do estudo. A concentração de aerossóis de pós com vários componentes também pode determinar-se por gravimetria. Todavia, são necessários para isso dados analíticos que demonstrem que a composição do produto transportado no aerossol é semelhante à do produto inicial. Se não se dispuser desses dados, pode ser necessário reanalisar periodicamente o produto químico em estudo (idealmente no aerossol) durante o ensaio. No caso dos agentes aerossolizados que possam evaporar-se ou sublimar, é necessário demonstrar que todas as fases são recolhidas pelo método escolhido.
25. Deve utilizar-se, se possível, apenas um lote do produto químico em estudo durante os ensaios e a amostra em estudo deve ser conservada em condições que preservem a sua pureza, homogeneidade e estabilidade. Antes de iniciar o estudo, deve caracterizar-se o produto químico em causa no que respeita à sua pureza e, se tecnicamente viável, à sua identidade e às quantidades dos contaminantes e impurezas nele identificados. Para o efeito, pode recorrer-se, entre outros, aos seguintes dados: tempos de retenção e áreas relativas de picos, pesos moleculares obtidos por espetrometria de massa ou cromatografia em fase gasosa ou outras estimativas. Embora a identidade da amostra a estudar não seja da responsabilidade do laboratório, pode ser aconselhável que este confirme, pelo menos, alguns aspetos da caracterização efetuada pelo cliente (cor, natureza física, etc.).
26. Deve manter-se a atmosfera de exposição tão constante quanto possível. Para demonstrar a estabilidade das condições de exposição, pode utilizar-se um dispositivo de monitorização em tempo real, tal como um fotómetro de aerossóis, para esses casos, ou, para vapores, um analisador de hidrocarbonetos totais. Deve medir-se a concentração real na câmara pelo menos três vezes por nível de exposição, em cada dia de exposição. Se isso não for viável, por limitações relacionadas com o caudal de ar ou devido a concentrações baixas, aceita-se uma amostra por período de exposição. Idealmente, essa amostra deve então ser colhida ao longo de todo o período de exposição. A concentração na câmara correspondente a uma determinada amostra não deve desviar-se da concentração média na câmara mais de 10 %, no caso de gases e vapores, nem mais de 20 %, no caso de aerossóis de líquidos ou de sólidos. Deve calcular-se e indicar-se no relatório o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio ( $t_{95}$ ). A duração da exposição corresponde ao tempo de geração do produto químico em estudo, incluído o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio ( $t_{95}$ ) e para o decaimento da concentração. O documento GD 39 (2) contém orientações para a estimativa do  $t_{95}$ .
27. No caso de misturas muito complexas de gases ou vapores e de aerossóis (por exemplo, atmosferas de combustão e produtos químicos gerados por produtos ou dispositivos finais específicos), o comportamento de cada fase na câmara de inalação pode ser diferente. Por esse motivo, deve escolher-se em cada fase (gás ou vapor e aerossol) pelo menos uma substância indicadora (substância analisada), normalmente a principal substância ativa da mistura. Se o produto químico em estudo for uma mistura, deve indicar-se no relatório a concentração analítica correspondente à mistura e não apenas a concentração correspondente ao ingrediente ativo ou à substância indicadora (substância analisada) em causa. O documento GD 39 (2) contém mais informações sobre as concentrações reais.

### Distribuição granulométrica do produto químico em estudo

28. Deve determinar-se a distribuição granulométrica dos aerossóis pelo menos semanalmente por nível de concentração, recorrendo a um impactor de cascata ou a outro instrumento, tal como um granulómetro aerodinâmico. Se for possível demonstrar a equivalência dos resultados obtidos pelo impactor de cascata e pelo instrumento alternativo, pode utilizar-se este último em todo o estudo.
29. Em paralelo ao instrumento primário, deve utilizar-se um segundo dispositivo, tal como um filtro gravimétrico ou um borbulhador de gás/impactor *impinger*, para confirmar a eficiência de captação do primeiro. As concentrações mássicas obtidas por análise granulométrica e por análise com filtros não devem diferir entre si mais do que valores razoáveis [ver o GD 39 (2)]. Se for possível demonstrar esta equivalência, a todas as concentrações ensaiadas, no início do estudo, não é necessário efetuar mais medições de confirmação. Por razões de bem-estar animal, devem tomar-se medidas para minimizar dados inconclusivos que possam obrigar à repetição do estudo.
30. É necessário efetuar uma análise granulométrica no caso dos vapores que possam condensar-se para formar aerossóis ou se forem detetadas partículas numa atmosfera de vapores suscetível de formar fases mistas.

## EXAMES

31. Os animais devem ser examinados clinicamente antes, durante e depois do período de exposição. Consoante a resposta dos animais durante a exposição, pode ser conveniente aumentar a frequência dos exames. Se for difícil examinar os animais devido aos tubos de contenção utilizados, à reduzida iluminação das câmaras de corpo inteiro ou à opacidade da atmosfera, deve-se examiná-los cuidadosamente depois da exposição. Os exames realizados antes da exposição do dia seguinte podem apreciar a eventual reversibilidade ou intensificação dos efeitos tóxicos.
32. Todos os exames devem ser registados, mantendo registos individuais para cada animal. Se forem eutanasiados animais ou forem encontrados animais mortos, deve registar-se o momento da morte com a maior exatidão possível.
33. Os exames a efetuar aos animais engaiolados devem incidir, nomeadamente, nas alterações da pele e da pelagem, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do sistema circulatório, do sistema nervoso, da atividade somatomotora e do comportamento. Deve estar-se atento a tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. A medição da temperatura retal pode corroborar uma bradipneia reflexa ou uma hipo/hipertermia relacionadas com a exposição ou com o confinamento. Entre as avaliações suplementares que podem incluir-se no protocolo de estudo contam-se as de parâmetros cinéticos ou ao nível da biomonitorização, da função pulmonar, da retenção de matérias fracamente solúveis acumuladas no tecido pulmonar e de alterações comportamentais.

## PESO CORPORAL

34. Regista-se o peso de cada animal pouco antes da primeira exposição (dia 0) e, em seguida, duas vezes por semana (por exemplo, às sextas-feiras e às segundas-feiras, para verificar a recuperação durante o fim de semana sem exposição, ou intervaladas de modo a possibilitar a avaliação da toxicidade sistémica), bem como no momento da morte ou da eutanásia. Se não se registarem efeitos nas duas primeiras semanas, durante o resto do estudo podem medir-se os pesos corporais apenas uma vez por semana. Os animais que integram os (eventuais) grupos satélites (para apreciação da reversibilidade) devem continuar a ser pesados semanalmente durante o período de recuperação. No termo do estudo, pesa-se cada animal pouco antes de ser eutanasiado, para não falsear o cálculo da relação entre o peso de cada órgão e o peso corporal.

## CONSUMO DE ALIMENTOS E DE ÁGUA

35. Mede-se semanalmente o consumo de alimentos, podendo também medir-se o consumo de água.

## PATOLOGIA CLÍNICA

36. Efetua-se uma avaliação de patologia clínica a todos os animais depois de eutanasiados, incluindo os dos grupos de controlo e dos grupos satélites (para apreciação da reversibilidade). Regista-se o lapso de tempo entre o termo da exposição e a colheita de sangue, em especial quando a reconstituição do parâmetro visado é rápida. Recomenda-se que, após o termo da exposição, sejam colhidas amostras para análise dos parâmetros com tempo de meia-vida plasmático curto – por exemplo, a carboxi-hemoglobina (COHb), a colinesterase (CHE), e a meta-hemoglobina (MetHb).
37. São enumerados no quadro 1 os parâmetros de patologia clínica normalmente exigidos nos estudos toxicológicos. A análise da urina não é exigida por rotina, mas pode efetuar-se quando a toxicidade prevista ou observada o aconselharem. Fica ao critério do diretor do estudo decidir avaliar outros parâmetros, para melhor caracterização da toxicidade do produto químico (por exemplo, colinesterase, lípidos, hormonas, equilíbrio ácido-base, meta-hemoglobina ou corpos de Heinz, creatinina-cinase, relação mielóide/eritroide, troponinas, gases no sangue arterial, lactato-desidrogenase, sorbitol-desidrogenase, glutamato-desidrogenase e gama-glutamil-transpeptidase).

Quadro 1

## Parâmetros clássicos de patologia clínica

Hematologia	
Contagem de eritrócitos	Contagem total de leucócitos
Hematócrito	Fórmula leucocitária
Concentração de hemoglobina	Contagem de plaquetas
Hemoglobina corpuscular média	Potencial de coagulação (escolher um):
Volume corpuscular médio	— tempo de protrombina
Concentração de hemoglobina corpuscular média	— tempo de coagulação
Reticulócitos	— tempo de tromboplastina parcial



Química clínica	
Glucose (*)	Alanina-aminotransferase
Colesterol total	Aspartato-aminotransferase
Triglicéridos	Fosfatase alcalina
Azoto ureico no sangue	Potássio
Bilirrubina total	Sódio
Creatinina	Cálcio
Proteínas totais	Fósforo
Albumina	Cloretos
Globulina	
Análise da urina (facultativa)	
Aspeto (cor e turvação)	Proteínas totais
Volume	Glucose
Densidade ou osmolalidade	Sangue/células sanguíneas
pH	
(*) Dado que um período longo de jejum pode distorcer as determinações da glucose dos animais expostos relativamente aos animais dos grupos de controlo, fica ao critério do diretor do estudo fazer ou não os animais jejuar. Se a opção for por um período de jejum, este deve ser adaptado à espécie – no caso do rato, pode ser de 16 horas (jejum noturno). Pode determinar-se a glucose em jejum após jejum noturno durante a última semana de exposição ou após jejum noturno antes da autópsia (neste caso, juntamente com todos os outros parâmetros de patologia clínica).	

38. Se houver indícios de que a zona principal de deposição e retenção são as vias respiratórias inferiores (isto é, os alvéolos), a lavagem broncoalveolar pode ser a técnica mais adequada para efetuar uma análise quantitativa de parâmetros que hipoteticamente permitam avaliar a relação entre a dose e os efeitos por esta induzidos, com especial incidência para alveolites, inflamações pulmonares e fosfolipidose. Este processo permite estudar convenientemente os efeitos nos alvéolos das doses aplicadas e a evolução das lesões alveolares daí resultantes. Podem determinar-se no fluido da lavagem broncoalveolar a contagem total de leucócitos, a fórmula leucocitária, as proteínas totais e a lactato-desidrogenase. Outros parâmetros eventualmente a ponderar são os indicativos de alterações lisossómicas, fosfolipidose e fibrose, bem como de irritações e reações inflamatórias alérgicas, que podem compreender a determinação de citocinas ou quimiocinas pró-inflamatórias. As determinações no fluido proveniente da lavagem broncoalveolar complementam muitas vezes os exames histopatológicos, mas não os substituem. O documento GD 39 (2) contém orientações sobre a realização da lavagem pulmonar.

#### MACROPATOLOGIA E PESO DO ÓRGÃOS

39. Os animais utilizados nos ensaios (incluindo os que morrerem durante o ensaio ou que forem eutanasiados e retirados do estudo por razões de bem-estar animal) devem ser completamente sangrados (se possível) e sujeitos a uma autópsia macroscópica. Deve registar-se o lapso de tempo entre o termo da última exposição de cada animal e o momento em que o animal é eutanasiado. Se não for possível realizar a autópsia imediatamente depois de detetada a morte do animal, este deve ser refrigerado (não congelado) a uma temperatura suficientemente baixa para minimizar a autólise. As autópsias devem ser efetuadas o mais rapidamente possível, normalmente não mais de um ou dois dias após a morte. Registam-se todas as alterações patológicas macroscópicas de cada animal, prestando especial atenção às alterações do aparelho respiratório.
40. Enumeram-se no quadro 2 os órgãos e tecidos a conservar num meio adequado, durante a autópsia macroscópica, para os exames histopatológicos. A preservação dos órgãos e tecidos indicados entre parênteses retos e de quaisquer outros não indicados fica ao critério do diretor do estudo. Os órgãos **indicados** a negrito devem ser separados dos tecidos aderentes e pesados ainda húmidos o mais rapidamente possível depois da dissecação, para evitar que sequem. A tireoide e os epidídimos só devem pesar-se se for necessário, porque os instrumentos utilizados para separar os tecidos aderentes podem comprometer a avaliação histopatológica. Logo depois da autópsia, fixam-se os tecidos e órgãos em formalina a 10 % tamponada ou com outro fixador adequado. A remoção dos tecidos aderentes só deve realizar-se 24 a 48 horas depois, consoante o fixador utilizado.

Quadro 2

**Órgãos e tecidos a conservar durante a autópsia macroscópica**

<b>Glândulas suprarrenais</b>	Vesículas seminais
Medula óssea (e/ou uma punção recente)	Medula espinal (cervical, mediotorácica e lombar)
<b>Encéfalo</b> (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/protuberância anelar)	<b>Baço</b>
[Olhos (retina, nervo ótico) e pálpebras]	Estômago
<b>Coração</b>	<b>Testículos</b>
<b>Rins</b>	<b>Timo</b>
Laringe (secção em três níveis, um dos quais compreendendo a base da epiglote)	Tiroide
<b>Fígado</b>	Traqueia (secção pelo menos em dois níveis, incluindo uma secção longitudinal na carina e uma secção transversal)
<b>Pulmões</b> (secção de cada lobo a um só nível, incluindo os brônquios principais)	[Bexiga urinária]
Gânglios linfáticos da região hilar dos pulmões, especialmente no caso de produtos químicos pouco solúveis que se apresentem sob a forma de partículas. Para exames e/ou estudos mais aprofundados de cariz imunológico, podem conservar-se outros gânglios linfáticos, nomeadamente os das regiões mediastinal, cervical/submandibular e/ou auricular.	Útero
Tecidos nasofaríngeos (secção pelo menos em quatro níveis, um dos quais compreendendo o canal nasofaríngeo e os tecidos linfáticos associados à mucosa nasal — " <i>nasal associated lymphoid tissue</i> ", NALT).	Todas as lesões macroscópicas
Esófago	
[Bolbo olfativo]	
Ovários	

41. Os pulmões são removidos intactos, pesados e instila-se-lhes um fixador adequado, à pressão de 20 a 30 cm de coluna de água, para conservar a estrutura pulmonar (5). Secciona-se cada lobo a um só nível (incluindo os brônquios principais); caso se proceda a lavagem pulmonar, secciona-se o lobo não lavado em três níveis (não sequenciais).
42. São examinados pelo menos quatro níveis dos tecidos nasofaríngeos, um dos quais deve compreender o canal nasofaríngeo (5)(6)(7)(8)(9), para possibilitar um exame adequado do epitélio escamoso, de transição (respiratório não ciliado), respiratório (respiratório ciliado) e olfativo, assim como o tecido linfático adjacente — NALT (10)(11). São examinados e três níveis da laringe, um dos quais deve incluir a base da epiglote (12). São examinados pelo menos dois níveis da traqueia, incluindo uma secção longitudinal na carina da bifurcação que dá origem aos brônquios extrapulmonares e uma secção transversal.

## HISTOPATOLOGIA

43. Deve efetuar-se uma avaliação histopatológica dos órgãos e tecidos indicados no quadro 2 a cada animal do grupo com a concentração mais elevada e dos grupos de controlo, bem como aos animais que morrerem ou forem eutanasiados durante o estudo. Deve prestar-se especial atenção ao aparelho respiratório, aos órgãos-alvo e às lesões macroscópicas. Os órgãos e tecidos que apresentem lesões nos animais do grupo com a concentração mais elevada devem ser examinados em todos os grupos. Fica ao critério do diretor do estudo efetuar avaliações histopatológicas a outros grupos, para evidenciar uma resposta clara à concentração. Caso se tenha constituído um grupo satélite de animais (para apreciação da reversibilidade), deve efetuar-se o exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos outros grupos expostos. Se o número de mortes prematuras ou outros problemas no grupo com a concentração mais elevada for excessivo, a ponto de comprometer a significância dos dados, efetua-se um exame histopatológico dos animais expostos ao nível de concentração imediatamente inferior. Deve procurar-se estabelecer correlações entre as observações macroscópicas e os resultados dos exames microscópicos.

## DADOS E RELATÓRIOS

**Dados**

44. Devem ser apresentados dados por animal relativos a peso corporal, consumo alimentar, patologias clínicas, macropatologias, peso dos órgãos e histopatologias. Devem ser resumidos os resultados dos exames clínicos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentaram sinais específicos de toxicidade, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados e o momento da morte de cada animal, complementados por uma descrição dos efeitos tóxicos e da evolução e reversibilidade destes, bem como pelos resultados das autópsias. Os resultados, quantitativos ou outros, devem ser avaliados por um método estatístico adequado. Os métodos estatísticos devem ser escolhidos no planeamento do estudo, podendo sê-lo qualquer método estatístico corrente adequado.

**Relatório dos ensaios**

45. Elementos a constar, quando pertinente, do relatório dos ensaios:

*Animais estudados e condições em que são mantidos*

- descrição das condições de engaiolamento, nomeadamente: número (ou alteração do número) de animais por gaiola, camas, temperatura e humidade relativa ambientes, fotoperíodo e dieta,
- espécie e estirpe utilizadas e, caso não sejam utilizados ratos, justificação da utilização de outra espécie. Podem apresentar-se dados originários da proveniência dos animais ou dados históricos, desde que correspondentes a animais sujeitos às mesmas condições de exposição, alojamento e jejum,
- número, idade e sexo,
- método de aleatorização,
- descrição de eventuais condicionamentos anteriores ao ensaio, nomeadamente ao nível da dieta, de quarentenas e do tratamento de doenças.

*Produto químico em estudo*

- natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas pertinentes (incluindo a isomerização),
- dados de identificação e, se for conhecido, número de registo CAS (*Chemical Abstract Service*).

*Veículo*

- justificação da utilização e da escolha do veículo (se não for água),
- dados históricos ou paralelos demonstrativos de que o veículo não interfere nos resultados do estudo.

*Câmaras de inalação*

- descrição pormenorizada – incluindo o volume e um esquema – das câmaras de inalação,
- origem e descrição do equipamento utilizado na exposição dos animais e na geração da atmosfera,
- equipamento de medição da temperatura, humidade, granulometria e concentração real,
- fonte de ar e sistema de climatização utilizado,
- métodos utilizados para calibrar o equipamento a fim de garantir a homogeneidade da atmosfera ensaiada,
- subpressão ou sobrepressão,
- pontos de exposição por câmara (de exposição unicamente nasal); localização dos animais na câmara (câmara de exposição de corpo inteiro),

- estabilidade da atmosfera utilizada nos ensaios,
- localização nas câmaras dos sensores térmicos e higrométricos e dos pontos de colheita de amostras da atmosfera ensaiada,
- tratamento do ar fornecido/evacuado,
- caudais de ar, caudal de ar em cada ponto de exposição (exposição unicamente nasal) ou relação entre o volume ocupado pelos animais e o volume da câmara (câmara de exposição de corpo inteiro),
- tempo necessário para as câmaras de inalação atingirem o equilíbrio ( $t_{95}$ ),
- número horário de substituições de volume,
- medidores (se existirem).

#### *Elementos relativos à exposição*

- fundamentação da escolha da concentração visada no estudo principal,
- concentrações nominais (dadas pela divisão da massa do produto químico em estudo introduzido na câmara de inalação pelo volume de ar total que nela circulou),
- concentrações reais do produto químico em estudo obtidas na zona de respiração dos animais; no caso das misturas que geram formas físicas heterogêneas (gases, vapores, aerossóis), pode analisar-se separadamente cada uma delas,
- as concentrações no ar devem indicar-se em unidades de massa (mg/l, mg/m<sup>3</sup>, etc.) e não de volume (ppm, ppb, etc.),
- distribuição granulométrica, diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) e desvio-padrão geométrico ( $\sigma_g$ ), incluindo os métodos de cálculo correspondentes; indicar também o resultado de cada análise granulométrica efetuada.

#### *Condições de realização dos ensaios*

- elementos sobre a preparação do produto químico estudado, nomeadamente sobre eventuais métodos de redução da granulometria de sólidos ou de preparação de soluções do produto químico,
- descrição (de preferência complementada por um esquema) do equipamento utilizado para gerar a atmosfera dos ensaios e para expor os animais a essa atmosfera,
- elementos relativos ao equipamento de monitorização da temperatura, humidade e caudal de ar nas câmaras (curvas de calibração),
- elementos relativos ao equipamento utilizado para colher as amostras para determinação da granulometria e da concentração nas câmaras,
- elementos sobre o método de análise química utilizado e sobre a validação desse método (incluindo o rendimento da recuperação do produto químico em estudo do meio amostrado),
- método utilizado para distribuir aleatoriamente os animais pelos grupos ensaiados e pelos grupos de controlo,
- elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),
- fundamentação da escolha das concentrações utilizadas nos ensaios.

#### *Resultados*

- quadro com a temperatura, a humidade e o caudal de ar nas câmaras,
- quadro com as concentrações nominais e reais nas câmaras,

- quadro com os dados granulométricos, nomeadamente dados analíticos sobre a colheita de amostras, a distribuição granulométrica e os cálculos de MMAD e  $\sigma_g$ ,
- quadro com os dados de resposta e as concentrações correspondentes a cada animal (animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, e natureza, intensidade, momento do aparecimento e duração dos efeitos),
- quadro com os pesos de cada animal,
- quadro dos consumos alimentares,
- quadro dos dados de patologia clínica,
- resultados da autópsia e resultados histopatológicos correspondentes a cada animal, se disponíveis,
- quadros dos restantes parâmetros medidos.

#### *Discussão e interpretação dos resultados*

- deve ser dada especial atenção à descrição dos métodos utilizados para satisfazer os critérios deste método de ensaio, nomeadamente no que respeita à concentração-limite e à granulometria,
- examinar em que medida, com base nos resultados globais, as partículas são respiráveis, em especial se os critérios granulométricos não forem satisfeitos,
- a apreciação global do estudo deve incidir igualmente na coerência dos métodos utilizados para determinar as concentrações nominal e real e deve dar conta da relação entre estas concentrações,
- referir a causa provável da morte e o modo de ação predominante (sistémico ou local),
- explicar por que razão terá sido necessário eutanasiar animais que apresentavam sinais de dor ou de grande sofrimento continuado com base nos critérios do documento de orientações da OCDE relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (3),
- identificar o(s) órgão(s)-alvo,
- determinar o NOAEL e o LOAEL (nível mínimo com observação de efeitos adversos).

#### *REFERÊNCIAS:*

- (1) OCDE (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412. Environment Directorate, OCDE, Paris.
- (2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.
- (3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.
- (4) Whalan J.E., Redden J.C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.
- (5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material. Witschi, H.P. e Brain, J.D. (eds.). Springer Verlag Heidelberg, p. 229-258.
- (6) Young J.T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1:309-312.
- (7) Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ. Health Perspect.* 85:231-238.

- 
- (8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In Waalkes M.P. e Ward J.M. (eds.) *Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series*. Raven Press, New York, 215-263.
  - (9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22:353-372.
  - (10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13:219-224.
  - (11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141:281-285.
  - (12) Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3):419-428.
  - (13) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).
-

## Apêndice 1

## DEFINIÇÃO

**Produto químico em estudo:** qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.»

- 5) Os capítulos B.29 e B.30 são substituídos pelos seguintes textos:

## «B.29. TOXICIDADE SUBCRÓNICA POR INALAÇÃO: ESTUDO DE 90 DIAS

## RESUMO

Este método B.29 revisto visa caracterizar integralmente a toxicidade por via inalatória do produto químico estudado, após um período de duração subcrónica (90 dias), e obter dados sólidos para quantificar os riscos por inalação. Expõem-se durante 90 dias (13 semanas), seis horas por dia, grupos constituídos por dez roedores machos e dez roedores fêmeas a três ou mais concentrações do produto químico em estudo (a), a ar filtrado (b, controlo negativo), e/ou ao veículo (c, controlo do veículo). Em geral, Os animais são expostos durante cinco dias por semana, mas admite-se que sejam expostos sete dias por semana. Ensaiam-se sempre machos e fêmeas, mas cada sexo pode ser exposto a concentrações diferentes, se um deles for reconhecidamente mais sensível ao produto químico do que o outro. Este método concede ao diretor do estudo flexibilidade suficiente para incluir grupos satélites (para apreciação da reversibilidade), eutanásias intercalares, lavagens broncoalveolares, testes neurológicos e exames histopatológicos e de patologia clínica suplementares, a fim de melhor caracterizar a toxicidade do produto químico em estudo.

## INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline 413* (2009) da OCDE. O *Test Guideline 413* (TG 413) inicial relativo à toxicidade subcrónica por inalação foi adotado em 1981 (1). O presente método B.29 é equivalente ao método TG 413 revisto (2009), tendo sido atualizado para refletir o estado da ciência e cumprir exigências atuais e futuras da regulamentação.
2. Os estudos de toxicidade subcrónica por inalação destinam-se principalmente a aferir das concentrações que a regulamentação deve prever para a avaliação dos riscos a que os trabalhadores estão sujeitos no local de trabalho. São igualmente utilizados para avaliar os riscos de exposição humana nos locais de habitação, associados aos meios de transporte e no ambiente. O método permite caracterizar os efeitos adversos resultantes da exposição diária por inalação, durante 90 dias (cerca de 10 % do tempo de vida do rato), ao produto químico em estudo. Os dados provenientes dos estudos de toxicidade subcrónica por inalação podem utilizar-se para quantificar riscos e para selecionar as concentrações a utilizar em estudos de toxicidade crónica. O presente método não se destina especificamente ao ensaio de nanomateriais. No final do capítulo e no documento de orientações n.º 39 (2) definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

3. A fim de melhorar a qualidade do estudo e de minimizar a utilização a animais, antes de realizar o estudo o laboratório de ensaios deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa. Entre os elementos úteis para a escolha das concentrações mais adequadas contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, resultados de ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana, dados (Q)SAR — "*quantitative structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins e dados provenientes de outros estudos de exposição repetida. Se estiver prevista a ocorrência ou ocorrerem manifestações de neurotoxicidade durante o estudo, fica ao critério do diretor deste incluir no estudo as avaliações suplementares que considere adequadas, tais como uma bateria de observações funcionais e determinações da atividade motora. Embora o momento da exposição possa ser um aspeto crítico em determinados exames, a realização destes estudos suplementares não deve interferir na conceção do estudo principal.
4. No caso dos produtos químicos corrosivos ou irritantes, podem ensaiar-se diluições adequadas, a concentrações que gerem o grau de toxicidade pretendido. Para mais informações, ver o documento de orientações n.º 39 (2). Ao expor animais a produtos químicos com tais características, as concentrações visadas devem ser suficientemente baixas para não causarem dor ou sofrimento intensos, sem deixarem de ser suficientes para que a curva de resposta à concentração abranja os níveis correspondentes aos objetivos do ensaio, nos planos científico e da regulamentação. Estas concentrações devem ser adaptadas a cada caso, de preferência com base num estudo exploratório convenientemente concebido, que forneça informações sobre o parâmetro crítico, eventuais limiares de irritação e o momento do aparecimento dos efeitos (ver os pontos 11 a 13). É necessário justificar as concentrações escolhidas em cada caso.
5. Os animais moribundos ou que apresentem sinais óbvios de dor ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados. Os animais moribundos são equiparados aos que morrem durante o ensaio. O documento de orientações da OCDE relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (3) define os critérios que devem presidir à decisão de eutanasiar animais moribundos ou em grande sofrimento, bem como orientações sobre o reconhecimento da morte previsível ou iminente.

## DESCRIÇÃO DO MÉTODO

### Escolha da espécie animal

6. Devem ser utilizados roedores adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais de uso corrente. A espécie preferida é o rato. É necessário justificar o recurso a outras espécies.

### Preparação dos animais

7. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas. No dia da seleção aleatória, os animais devem ser adultos jovens com sete a nove semanas, de peso corporal não desviado mais de 20 % do peso médio correspondente a cada sexo. Selecionam-se os animais aleatoriamente, marcam-se para identificação individual e mantêm-se nas suas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início do ensaio, para aclimação às condições laboratoriais.

### Manutenção dos animais

8. É necessário identificar individualmente cada animal, de preferência com um respondedor (*transponder*) subcutâneo, para facilitar as observações e evitar confusões. A temperatura do biotério deve ser de  $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ . O ideal será manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, embora isto possa não ser possível ao utilizar água como veículo. Antes e depois das exposições, os animais são geralmente engaiolados por sexo e por concentração, mas o número de animais por gaiola não deve dificultar a clara observação de cada animal e deve minimizar as perdas devidas a lutas ou canibalismo. Quando se opta pela exposição unicamente nasal dos animais, pode ser necessário aclimatá-los aos tubos de contenção. Estes não devem provocar aos animais tensões físicas, térmicas ou dinâmicas excessivas. A contenção dos animais pode afetar parâmetros fisiológicos como a temperatura corporal (hipertermia) e/ou o volume respirado por minuto. Caso se disponha de dados genéricos reveladores de que nenhuma destas alterações ocorre em grau apreciável, não será necessária a adaptação prévia aos tubos de contenção. Os animais cujo corpo seja exposto na totalidade a um aerossol devem permanecer em gaiolas individuais durante a exposição, para evitar que o aerossol seja filtrado pela pelagem dos que com eles coabitem. Exceto nos períodos de exposição, podem utilizar-se dietas convencionais certificadas de laboratório, com fornecimento ilimitado de água potável da rede pública. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão.

### Câmaras de inalação

9. Ao escolher-se a câmara de inalação, deve ter-se em conta a natureza do produto químico em estudo e o objetivo do ensaio. Privilegia-se o modo de exposição unicamente nasal, termo que abrange as exposições "unicamente da cabeça", "unicamente do nariz" e "unicamente do focinho". A exposição unicamente nasal é geralmente preferida no estudo de aerossóis de líquidos ou de sólidos, ou de vapores que possam condensar-se e formar aerossóis. Para determinados objetivos do estudo, poderá ser melhor recorrer ao modo de exposição de corpo inteiro, mas será necessário justificá-lo no relatório. Para garantir estabilidade atmosférica nas câmaras de corpo inteiro, o volume de todos os animais presentes em cada câmara não deve exceder 5 % do volume da câmara. O documento GD 39 (2) descreve os princípios, vantagens e desvantagens das técnicas de exposição unicamente nasal e de corpo inteiro.

## ESTUDOS DA TOXICIDADE

### Concentrações-limite

10. Contrariamente aos estudos de toxicidade aguda, nos estudos de toxicidade subcrónica por inalação não está definida nenhuma concentração-limite. Na escolha da concentração máxima a ensaiar, deve ter-se em conta a concentração máxima atingível, o nível de exposição humana mais desfavorável, a necessidade de manter um fornecimento adequado de oxigénio e/ou considerações de bem-estar animal. Se os dados disponíveis não permitirem estabelecer limites, podem utilizar-se os valores-limite de exposição aguda fixados no Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (13) — concentração máxima até 5 mg/l para aerossóis, 20 mg/l para vapores e 20 000 ppm para gases; ver igualmente o GD 39 (2). Se for necessário exceder estes limites ao ensaiar gases ou produtos químicos muito voláteis (por exemplo, refrigerantes), haverá que justificá-lo. A concentração-limite deve induzir efeitos tóxicos inequívocos sem gerar tensões desnecessárias nos animais nem afetar a longevidade dos mesmos (3).

### Estudo exploratório

11. Antes de iniciar o estudo principal, é geralmente necessário realizar um estudo exploratório. Um estudo exploratório com as características aqui definidas é mais completo do que um estudo preliminar, por não se limitar à escolha das concentrações. O êxito do estudo principal pode depender dos conhecimentos adquiridos num estudo exploratório. Este pode, por exemplo, fornecer informações técnicas sobre métodos de análise, granulometria, mecanismos de toxicidade, dados histopatológicos e de patologia clínica e estimativas do nível sem observação de efeitos adversos (NOAEL) e da concentração máxima tolerada no estudo principal. Fica ao critério do diretor do estudo recorrer a um estudo exploratório para determinar o limite mínimo de irritação do aparelho respiratório (por exemplo, por meio de uma histopatologia do aparelho respiratório, de testes da função pulmonar ou de uma lavagem broncoalveolar), a concentração máxima que os animais toleram sem tensões excessivas e os parâmetros que melhor caracterizam a toxicidade do produto químico em estudo.



12. O estudo exploratório pode abranger uma ou mais concentrações. Consoante os parâmetros escolhidos, devem expor-se a cada concentração três a seis machos e três a seis fêmeas. A duração deste estudo varia entre cinco dias, no mínimo, e geralmente não mais de 28 dias. É necessário justificar no relatório as concentrações escolhidas para o estudo principal. O objetivo deste último é demonstrar a existência de uma relação entre a concentração e a resposta obtida para o parâmetro previsivelmente mais sensível. Idealmente, a concentração mais baixa deve ser a concentração sem efeitos adversos observáveis e a concentração mais alta deve induzir efeitos tóxicos inequívocos, sem gerar tensões desnecessárias nos animais nem afetar a longevidade dos mesmos (3).
13. Ao escolher os níveis de concentração para o estudo exploratório, devem ponderar-se todas as informações disponíveis, incluindo relações estrutura-atividade e dados relativos a produtos químicos semelhantes (ver o ponto 3). O estudo exploratório pode confirmar ou refutar a escolha dos parâmetros mais sensíveis segundo critérios mecanísticos, por exemplo, a inibição da colinesterase por organofosforados, a formação de meta-hemoglobina por agentes eritrocitotóxicos, as hormonas tiroideas ( $T_3$  e  $T_4$ ), no caso dos agentes tiorotóxicos, proteínas, a LDH, ou a presença de neutrófilos na lavagem broncoalveolar, no caso de partículas inócuas fracamente solúveis ou de aerossóis irritantes dos pulmões.

#### **Estudo principal**

14. Um estudo principal de toxicidade subcrónica compreende geralmente três níveis de concentração, bem como, em paralelo, os controlos negativo (do ar) e/ou do veículo (ver o ponto 18). Para facilitar a seleção dos níveis de exposição, devem ser utilizados todos os dados disponíveis, nomeadamente resultados de estudos de toxicidade sistémica, metabólicos e cinéticos (deve ter-se especial cuidado em evitar níveis de concentração elevados que saturam os processos cinéticos). Cada grupo de ensaio compreende a exposição de dez roedores machos e dez roedores fêmeas ao produto químico em estudo, durante seis horas por dia e cinco dias por semana, ao longo de treze semanas (a duração total do estudo é, pelo menos, de 90 dias). Os animais também podem ser expostos sete dias por semana (por exemplo, ao ensaiar produtos farmacêuticos inalados). Se um dos sexos for reconhecidamente mais sensível ao produto químico em estudo, pode expor-se cada sexo a concentrações diferentes das utilizadas para o outro, a fim de otimizar a resposta à concentração como se refere no ponto 15. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Se a duração da exposição for inferior a seis horas por dia ou se for necessário realizar um estudo de exposição de longa duração (por exemplo, 22 horas por dia) de corpo inteiro [ver o GD 39 (2)], será necessário justificá-lo. Durante o período de exposição, a alimentação deve ser suspensão, exceto se a exposição exceder seis horas. Durante as exposições de corpo inteiro pode continuar a fornecer-se água.
15. As concentrações visadas escolhidas devem permitir identificar o(s) órgão(s)-alvo e evidenciar uma relação clara entre a concentração e a resposta obtida:
  - o nível de concentração mais elevado deve gerar efeitos tóxicos, mas não causar sintomas deletérios nem mortalidade, que impediriam a interpretação dos resultados,
  - o espaçamento do nível ou níveis de concentração intermédios deve permitir uma gradação dos efeitos tóxicos entre os correspondentes aos das concentrações mais baixa e mais elevada,
  - o nível de concentração mais baixo não deve ter efeitos tóxicos ou, se os tiver, estes devem ser reduzidos.

#### **Eutanásias intercalares**

16. Caso esteja prevista no estudo a realização de eutanásias intercalares, os efetivos expostos a cada nível de concentração devem ser aumentados no número de animais a eutanasiar antes da conclusão do estudo. É necessário fundamentar a realização de eutanásias intercalares e as análises estatísticas devem tê-las devidamente em conta.

#### **Estudo de grupos satélites (para apreciação da reversibilidade)**

17. Pode recorrer-se a um estudo satélite para observar a reversibilidade, a persistência ou o aparecimento diferido de efeitos tóxicos durante um período adequado, não inferior a 14 dias, após o termo da exposição. Compõem estes grupos dez machos e dez fêmeas, que são expostos ao mesmo tempo que os animais ensaiados no estudo principal. Os animais dos grupos satélites são expostos à concentração mais elevada do produto químico em estudo e devem ser complementados pelos grupos necessários de controlo do ar e/ou do veículo em paralelo (ver o ponto 18).

#### **Animais de controlo**

18. Os animais de controlo negativo (do ar) em paralelo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos que participam no ensaio principal, exceto que são expostos a ar filtrado em vez de ao produto químico em estudo. Se for utilizada água ou outra substância para gerar a atmosfera ensaiada, deve incluir-se no estudo, em vez do grupo de controlo negativo (do ar), um grupo de controlo do veículo. Sempre que possível, o veículo utilizado deve ser água. Se assim for, os animais são expostos a controlo a ar com a mesma humidade relativa

que o ar utilizado para os grupos expostos ao produto químico em estudo. A escolha do veículo mais adequado deve basear-se em dados históricos ou num estudo prévio convenientemente realizado. Se não se conhecer bem a toxicidade do veículo, fica ao critério do diretor do estudo utilizar em simultâneo um controlo negativo (do ar) e um controlo do veículo, embora se desaconselhe fortemente este procedimento. Se os dados históricos revelarem que o veículo não é tóxico, não haverá necessidade de um grupo de controlo negativo (do ar) e apenas deve utilizar-se um controlo do veículo. Se um estudo prévio de um produto químico incorporado num determinado veículo não revelar toxicidade, conclui-se que o veículo em causa não é tóxico à concentração ensaiada, devendo utilizar-se esse controlo do veículo.

#### CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

##### Administração das concentrações

- Os animais são expostos ao produto químico em estudo sob a forma de gás, vapor, aerossol ou de uma mistura destes. O estado físico a ensaiar depende das propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, das concentrações escolhidas e/ou da forma física cuja probabilidade de presença durante a manipulação e utilização do mesmo seja maior. Os produtos químicos higroscópicos ou quimicamente reativos devem ser ensaiados em atmosfera seca. Devem tomar-se precauções para evitar concentrações que possam provocar explosões. As matérias em partículas podem ser sujeitas a processos mecânicos para reduzir a granulometria. Para mais orientações, consultar o documento GD 39 (2).

##### Distribuição granulométrica

- Os aerossóis e os vapores que possam condensar-se em aerossóis devem ser objeto de análise granulométrica. Para que todas as zonas pertinentes do aparelho respiratório sejam expostas, recomenda-se a utilização de aerossóis com diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) compreendido entre 1  $\mu\text{m}$  e 3  $\mu\text{m}$  e desvio-padrão geométrico ( $\sigma_g$ ) compreendido entre 1,5 e 3,0 (4). Deve fazer-se o razoavelmente possível para respeitar estas condições, sendo necessário um parecer especializado caso isso não se consiga. Por exemplo, as partículas dos fumos metálicos são mais pequenas do que o limite inferior indicado, ao passo que as partículas carregadas e as fibras podem exceder o limite superior.

##### Incorporação do produto químico em estudo num veículo

- Idealmente, o produto químico em estudo deve ser ensaiado sem que tenha sido incorporado num veículo. Se for necessário utilizar um veículo para obter a concentração e a granulometria adequadas do produto químico em causa, deve preferir-se a água. Se o produto químico for dissolvido num veículo, será necessário comprovar que se mantém estável.

#### MONITORIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

##### Caudal de ar nas câmaras

- Durante cada exposição, é necessário regular cuidadosamente, monitorizar continuamente e registar pelo menos de hora a hora o caudal de ar através de cada câmara. A monitorização em tempo real da concentração (ou estabilidade no tempo) da atmosfera em estudo constitui uma medida permanente de todos os parâmetros dinâmicos e um meio indireto de regular os que têm importância para a inalação. Se a concentração for monitorizada em tempo real, pode reduzir-se a frequência da medição do caudal de ar a apenas uma medição diária por exposição. É necessário ter especial cuidado em evitar reinalações nas câmaras de exposição unicamente nasal. A concentração de oxigénio não deve ser inferior a 19 % e a concentração de dióxido de carbono não deve exceder 1 %. Se houver razões para crer que estas concentrações não são respeitadas, é necessário medi-las. Se as medições efetuadas no primeiro dia de exposição mostrarem que as concentrações destes gases estão aos níveis corretos, não é necessário voltar a medi-las.

##### Temperatura e humidade relativa nas câmaras

- Deve manter-se a temperatura nas câmaras a 22 °C  $\pm$  3 °C. Tanto no caso das exposições unicamente nasais como das exposições do corpo inteiro, é necessário monitorizar continuamente a humidade relativa na zona de respiração dos animais e, se possível, registá-la de hora a hora durante cada exposição. É preferível manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, mas isso pode não ser possível (por exemplo, quando se estudam misturas aquosas) ou pode não ser mensurável (devido a interferências do produto químico em estudo com o método de ensaio).

##### Concentração nominal do produto químico em estudo

- Sempre que possível, deve calcular-se e registar-se a concentração nominal na câmara de exposição. Esta é dada pela divisão da massa gerada do produto químico em estudo pelo volume de ar total que circulou pelo sistema da câmara de inalação. A concentração nominal não é utilizada para caracterizar a exposição dos animais, mas a sua comparação com a concentração real dá uma indicação da eficácia de geração do sistema de ensaio, podendo ser utilizada para detetar problemas a esse nível.

### Concentração real do produto químico em estudo

25. Entende-se por "concentração real do produto químico em estudo", a concentração do produto químico nas amostras colhidas na zona de respiração dos animais da câmara de inalação. As concentrações reais podem determinar-se por métodos específicos (por exemplo, amostragem direta ou métodos de adsorção ou de reação química e posterior caracterização analítica) ou por métodos inespecíficos, tais como gravimetria após filtração. O método gravimétrico só é aceitável para aerossóis de pós com um único componente ou de líquidos pouco voláteis e deve apoiar-se em caracterizações adequadas específicas do produto químico em causa efetuadas antes da realização do estudo. A concentração de aerossóis de pós com vários componentes também pode determinar-se por gravimetria. Todavia, são necessários para isso dados analíticos que demonstrem que a composição do produto transportado no aerossol é semelhante à do produto inicial. Se não se dispuser desses dados, pode ser necessário reanalisar periodicamente o produto químico em estudo (idealmente no aerossol) durante o ensaio. No caso dos agentes aerossolizados que possam evaporar-se ou sublimar, é necessário demonstrar que todas as fases são recolhidas pelo método escolhido.
26. Deve utilizar-se, se possível, apenas um lote do produto químico em estudo durante os ensaios e a amostra em estudo deve ser conservada em condições que preservem a sua pureza, homogeneidade e estabilidade. Antes de iniciar o estudo, deve caracterizar-se o produto químico em causa no que respeita à sua pureza e, se tecnicamente viável, à sua identidade e às quantidades dos contaminantes e impurezas nele identificados. Para o efeito, pode recorrer-se, entre outros, aos seguintes dados: tempos de retenção e áreas relativas de picos, pesos moleculares obtidos por espetrometria de massa ou cromatografia em fase gasosa ou outras estimativas. Embora a identidade da amostra a estudar não seja da responsabilidade do laboratório, pode ser aconselhável que este confirme, pelo menos, alguns aspetos da caracterização efetuada pelo cliente (cor, natureza física, etc.).
27. Deve manter-se a atmosfera de exposição tão constante quanto possível. Para demonstrar a estabilidade das condições de exposição, pode utilizar-se um dispositivo de monitorização em tempo real, tal como um fotómetro de aerossóis, para esses casos, ou, para vapores, um analisador de hidrocarbonetos totais. Deve medir-se a concentração real na câmara pelo menos três vezes por nível de exposição, em cada dia de exposição. Se isso não for viável, por limitações relacionadas com o caudal de ar ou devido a concentrações baixas, aceita-se uma amostra por período de exposição. Idealmente, essa amostra deve então ser colhida ao longo de todo o período de exposição. A concentração na câmara correspondente a uma determinada amostra não deve desviar-se da concentração média na câmara mais de 10 %, no caso de gases e vapores, nem mais de 20 %, no caso de aerossóis de líquidos ou de sólidos. Deve calcular-se e indicar-se no relatório o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio ( $t_{95}$ ). A duração da exposição corresponde ao tempo de geração do produto químico em estudo, incluído o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio ( $t_{95}$ ) e para o decaimento da concentração. O documento GD 39 (2) contém orientações para a estimativa do  $t_{95}$ .
28. No caso de misturas muito complexas de gases ou vapores e de aerossóis (por exemplo, atmosferas de combustão e produtos químicos gerados por produtos ou dispositivos finais específicos), o comportamento de cada fase na câmara de inalação pode ser diferente. Por esse motivo, deve escolher-se em cada fase (gás ou vapor e aerossol) pelo menos uma substância indicadora (substância analisada), normalmente o principal ingrediente ativo da mistura. Se o produto químico em estudo for uma mistura, deve indicar-se no relatório a concentração analítica correspondente à mistura e não apenas a concentração correspondente ao ingrediente ativo ou à substância indicadora (substância analisada) em causa. O documento GD 39 (2) contém mais informações sobre as concentrações reais.

### Distribuição granulométrica do produto químico em estudo

29. Deve determinar-se a distribuição granulométrica dos aerossóis pelo menos semanalmente por nível de concentração, recorrendo a um impactor de cascata ou a outro instrumento, tal como um granulómetro aerodinâmico. Se for possível demonstrar a equivalência dos resultados obtidos pelo impactor de cascata e pelo instrumento alternativo, pode utilizar-se este último em todo o estudo.
30. Em paralelo ao instrumento primário, deve utilizar-se um segundo dispositivo, tal como um filtro gravimétrico ou um borbulhador de gás/impactor *impinger*, para confirmar a eficiência de captação do primeiro. As concentrações mássicas obtidas por análise granulométrica e por análise com filtros não devem diferir entre si mais do que valores razoáveis [ver o GD 39 (2)]. Se for possível demonstrar esta equivalência, a todas as concentrações ensaiadas, no início do estudo, não é necessário efetuar mais medições de confirmação. Por razões de bem-estar animal, devem tomar-se medidas para minimizar dados inconclusivos que possam obrigar à repetição do estudo.
31. É necessário efetuar uma análise granulométrica no caso dos vapores que possam condensar-se para formar aerossóis ou se forem detetadas partículas numa atmosfera de vapores suscetível de formar fases mistas.

## EXAMES

32. Os animais devem ser examinados clinicamente antes, durante e depois do período de exposição. Consoante a resposta dos animais durante a exposição, pode ser conveniente aumentar a frequência dos exames. Se for difícil examinar os animais devido aos tubos de contenção utilizados, à reduzida iluminação das câmaras de corpo inteiro ou à opacidade da atmosfera, deve-se examiná-los cuidadosamente depois da exposição. Os exames realizados antes da exposição do dia seguinte podem apreciar a eventual reversibilidade ou intensificação dos efeitos tóxicos.
33. Todos os exames devem ser registados, mantendo registos individuais para cada animal. Se forem eutanasiados animais ou forem encontrados animais mortos, deve registar-se o momento da morte com a maior exatidão possível.
34. Os exames a efetuar aos animais engaiolados devem incidir, nomeadamente, nas alterações da pele e da pelagem, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do sistema circulatório, do sistema nervoso, da atividade somatomotora e do comportamento. Deve estar-se atento a tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. A medição da temperatura retal pode corroborar uma bradipneia reflexa ou uma hipo/hipertermia relacionadas com a exposição ou com o confinamento. Entre as avaliações suplementares que podem incluir-se no protocolo de estudo contam-se as de parâmetros cinéticos ou ao nível da biomonitorização, da função pulmonar, da retenção de matérias fracamente solúveis acumuladas no tecido pulmonar e de alterações comportamentais.

## PESO CORPORAL

35. Regista-se o peso de cada animal pouco antes da primeira exposição (dia 0) e, em seguida, duas vezes por semana (por exemplo, às sextas-feiras e às segundas-feiras, para verificar a recuperação durante o fim de semana sem exposição, ou intervaladas de modo a possibilitar a avaliação da toxicidade sistémica), bem como no momento da morte ou da eutanásia. Se não se registarem efeitos nas quatro primeiras semanas, durante o resto do estudo podem medir-se os pesos corporais apenas uma vez por semana. Os animais que integram os (eventuais) grupos satélites (para apreciação da reversibilidade) devem continuar a ser pesados semanalmente durante o período de recuperação. No termo do estudo, pesa-se cada animal pouco antes de ser eutanasiado, para não falsear o cálculo da relação entre o peso de cada órgão e o peso corporal.

## CONSUMO DE ALIMENTOS E DE ÁGUA

36. Mede-se semanalmente o consumo de alimentos, podendo também medir-se o consumo de água.

## PATOLOGIA CLÍNICA

37. Efetua-se uma avaliação de patologia clínica a todos os animais depois de eutanasiados, incluindo os dos grupos de controlo e dos grupos satélites (para apreciação da reversibilidade). Regista-se o lapso de tempo entre o termo da exposição e a colheita de sangue, em especial quando a reconstituição do parâmetro visado é rápida. Recomenda-se que, após o termo da exposição, se colham amostras para análise dos parâmetros com tempo de meia-vida plasmático curto – por exemplo, a carboxi-hemoglobina (COHb), a colinesterase (CHE), e a meta-hemoglobina (MetHb).
38. Enumera-se no quadro 1 os parâmetros de patologia clínica normalmente exigidos nos estudos toxicológicos. A análise da urina não é exigida por rotina, mas pode efetuar-se quando a toxicidade prevista ou observada o aconselharem. Fica ao critério do diretor do estudo decidir avaliar outros parâmetros, para melhor caracterização da toxicidade do produto químico (por exemplo, colinesterase, lípidos, hormonas, equilíbrio ácido-base, meta-hemoglobina ou corpos de Heinz, creatinina-cinase, relação mieloide/eritroide, troponinas, gases no sangue arterial, lactato-desidrogenase, sorbitol-desidrogenase, glutamato-desidrogenase e gama-glutamil-transpeptidase).

## Quadro 1

## Parâmetros clássicos de patologia clínica

Hematologia	
Contagem de eritrócitos	Contagem total de leucócitos
Hematócrito	Fórmula leucocitária
Concentração de hemoglobina	Contagem de plaquetas
Hemoglobina corpuscular média	Potencial de coagulação (escolher um):
Volume corpuscular médio	— tempo de protrombina
Concentração de hemoglobina corpuscular média	— tempo de coagulação
Reticulócitos	— tempo de tromboplastina parcial

Química clínica	
Glucose (*)	Alanina-aminotransferase
Colesterol total	Aspartato-aminotransferase
Triglicéridos	Fosfatase alcalina
Azoto ureico no sangue	Potássio
Bilirrubina total	Sódio
Creatinina	Cálcio
Proteínas totais	Fósforo
Albumina	Cloretos
Globulina	
Análise da urina (facultativa)	
Aspeto (cor e turvação)	Proteínas totais
Volume	Glucose
Densidade ou osmolalidade	Sangue/células sanguíneas
pH	

(\*) Dado que um período longo de jejum pode distorcer as determinações da glucose dos animais expostos relativamente aos animais dos grupos de controlo, fica ao critério do diretor do estudo fazer ou não os animais jejuar. Se a opção for por um período de jejum, este deve ser adaptado à espécie — no caso do rato, pode ser de 16 horas (jejum noturno). Pode determinar-se a glucose em jejum após jejum noturno durante a última semana de exposição ou após jejum noturno antes da autópsia (neste caso, juntamente com todos os outros parâmetros de patologia clínica).

39. Se houver indícios de que a zona principal de deposição e retenção são as vias respiratórias inferiores (isto é, os alvéolos), a lavagem broncoalveolar pode ser a técnica mais adequada para efetuar uma análise quantitativa de parâmetros que hipoteticamente permitam avaliar a relação entre a dose e os efeitos por esta induzidos, com especial incidência para alveolites, inflamações pulmonares e fosfolipidose. Este processo permite estudar convenientemente os efeitos nos alvéolos das doses aplicadas e a evolução das lesões alveolares daí resultantes. Podem determinar-se no fluido da lavagem broncoalveolar a contagem total de leucócitos, a fórmula leucocitária, as proteínas totais e a lactato-desidrogenase. Outros parâmetros eventualmente a ponderar são os indicativos de alterações lisossómicas, fosfolipidose, fibrose, bem como de irritações e reações inflamatórias alérgicas, que podem compreender a determinação de citocinas ou quimiocinas pró-inflamatórias. As determinações no fluido proveniente da lavagem broncoalveolar complementam muitas vezes os exames histopatológicos, mas não os substituem. O documento GD 39 (2) contém orientações sobre a realização da lavagem pulmonar.

#### EXAME OFTALMOLÓGICO

40. Recorrendo a um oftalmoscópio ou a dispositivo equivalente, efetua-se um exame oftalmológico do fundo do olho, dos meios refrativos, da íris e da conjuntiva de cada animal antes de administrar o produto químico em estudo e, no termo do estudo, aos animais do grupo com a concentração mais elevada e dos grupos de controlo. Caso sejam detetadas alterações oculares, devem examinar-se os animais dos outros grupos, incluindo o grupo satélite (para apreciação da reversibilidade).

#### MACROPATOLOGIA E PESO DO ÓRGÃOS

41. Os animais utilizados nos ensaios (incluindo os que morrerem durante o ensaio ou que forem eutanasiados e retirados do estudo por razões de bem-estar animal) devem ser completamente sangrados (se possível) e sujeitos a uma autópsia macroscópica. Deve registar-se o lapso de tempo entre o termo da última exposição de cada animal e o momento em que o animal é eutanasiado. Se não for possível realizar a autópsia imediatamente depois de detetada a morte do animal, este deve ser refrigerado (não congelado) a uma temperatura suficientemente baixa para minimizar a autólise. As autópsias devem ser efetuadas o mais rapidamente possível, normalmente não mais de um ou dois dias após a morte. Registam-se todas as alterações patológicas macroscópicas de cada animal, prestando especial atenção às alterações do aparelho respiratório.
42. Enumeram-se no quadro 2 os órgãos e tecidos a conservar num meio adequado, durante a autópsia macroscópica, para os exames histopatológicos. A preservação dos órgãos e tecidos indicados entre parênteses retos e de quaisquer outros não indicados fica ao critério do diretor do estudo. Os órgãos indicados a **negrito** devem ser separados dos tecidos aderentes e pesados ainda húmidos o mais rapidamente possível depois da dissecação, para evitar que sequem. A tiroide e os epidídimos só devem pesar-se se for necessário, porque os instrumentos utilizados para separar os tecidos aderentes podem comprometer a avaliação histopatológica. Logo depois da autópsia, fixam-se os tecidos e órgãos em formalina a 10 % tamponada ou com outro fixador adequado. A remoção dos tecidos aderentes só deve realizar-se 24 a 48 horas depois, consoante o fixador utilizado.

Quadro 2

**Órgãos e tecidos a conservar durante a autópsia macroscópica**

<b>Glândulas suprarrenais</b>	Esófago
Aorta	[Bolbo olfativo]
Medula óssea (e/ou uma punção recente)	<b>Ovários</b>
<b>Encéfalo</b> (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/protuberância anelar)	Pâncreas
Cego	Glândulas paratiroides
Cólon	Nervo periférico (ciático ou tibial), de preferência na vizinhança do músculo
Duodeno	Hipófise
<b>[Epidídimos]</b>	Próstata
[Olhos (retina, nervo ótico) e pálpebras]	Reto
Fémur e articulação rotular	Glândulas salivares
Vesícula biliar (se presente)	Vesículas seminais
[Glândulas de Harder]	Pele
<b>Coração</b>	Medula espinal (cervical, mediotorácica e lombar)
Íleo	<b>Baço</b>
Jejuno	Esterno
<b>Rins</b>	Estômago
[Glândulas lacrimais (extraorbitais)]	Dentes
Laringe (secção em três níveis, incluindo a base da epiglote)	<b>Testículos</b>
<b>Fígado</b>	<b>Tímo</b>
<b>Pulmões</b> (secção de cada lobo a um só nível, incluindo os brônquios principais)	<b>Tiroide</b>
Gânglios linfáticos da região hilar dos pulmões, especialmente no caso de produtos químicos pouco solúveis que se apresentem sob a forma de partículas. Para exames e/ou estudos mais aprofundados de cariz imunológico, podem conservar-se outros gânglios linfáticos, nomeadamente os das regiões mediastinal, cervical/submandibular e/ou auricular.	[Língua]
Gânglios linfáticos (distais relativamente à porta de entrada)	Traqueia (secção pelo menos em dois níveis, incluindo uma secção longitudinal na carina e uma secção transversal)
Glândulas mamárias (nas fêmeas)	[Ureteres]
Músculo (coxa)	[Uretra]
Tecidos nasofaríngeos (secção pelo menos em quatro níveis, um dos quais compreendendo o canal nasofaríngeo e os tecidos linfáticos associados à mucosa nasal — "nasal associated lymphoid tissue", NALT).	[Bexiga urinária]
	<b>Útero</b>
	Órgãos-alvo
	Todas as massas e lesões macroscópicas

43. Removem-se os pulmões intactos, pesam-se e instila-se-lhes um fixador adequado, à pressão de 20 a 30 cm de coluna de água, para conservar a estrutura pulmonar (5) Secciona-se cada lobo a um só nível (incluindo os brônquios principais); caso se proceda a lavagem pulmonar, secciona-se o lobo não lavado em três níveis (não sequenciais).

44. Examinam-se pelo menos quatro níveis dos tecidos nasofaríngeos, um dos quais deve compreender o canal nasofaríngeo (5)(6)(7)(8)(9), para possibilitar um exame adequado do epitélio escamoso, de transição (respiratório não ciliado), respiratório (respiratório ciliado) e olfativo, assim como o tecido linfático adjacente — NALT (10)(11). Examinam-se três níveis da laringe, um dos quais deve incluir a base da epiglote (12). Examinam-se pelo menos dois níveis da traqueia, incluindo uma secção longitudinal na carina da bifurcação que dá origem aos brônquios extrapulmonares e uma secção transversal.

#### HISTOPATOLOGIA

45. Deve efetuar-se uma avaliação histopatológica dos órgãos e tecidos indicados no quadro 2 a cada animal do grupo com a concentração mais elevada e dos grupos de controlo, bem como aos animais que morrerem ou forem eutanasiados durante o estudo. Deve prestar-se especial atenção ao aparelho respiratório, aos órgãos-alvo e às lesões macroscópicas. Os órgãos e tecidos que apresentem lesões nos animais do grupo com a concentração mais elevada devem ser examinados em todos os grupos. Fica ao critério do diretor do estudo efetuar avaliações histopatológicas a outros grupos, para evidenciar uma resposta clara à concentração. Caso se tenha constituído um grupo satélite de animais (para apreciação da reversibilidade), deve efetuar-se o exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos outros grupos expostos. Se o número de mortes prematuras ou outros problemas no grupo com a concentração mais elevada for excessivo, a ponto de comprometer a significância dos dados, efetua-se um exame histopatológico dos animais expostos ao nível de concentração imediatamente inferior. Deve procurar-se estabelecer correlações entre as observações macroscópicas e os resultados dos exames microscópicos.

#### DADOS E RELATÓRIOS

##### Dados

46. Devem apresentar-se dados por animal relativos a peso corporal, consumo alimentar, patologias clínicas, macropatologias, peso dos órgãos e histopatologias. Devem resumir-se os resultados dos exames clínicos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentaram sinais específicos de toxicidade, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados e o momento da morte de cada animal, complementados por uma descrição dos efeitos tóxicos e da evolução e reversibilidade destes, bem como pelos resultados das autópsias. Os resultados, quantitativos ou descritivos, devem ser avaliados por um método estatístico adequado. Os métodos estatísticos devem ser escolhidos no planeamento do estudo, podendo sê-lo qualquer método estatístico corrente adequado.

##### Relatório dos ensaios

47. Elementos a constar, quando pertinente, do relatório dos ensaios:

##### *Animais estudados e condições em que são mantidos*

- descrição das condições de engaiolamento, nomeadamente: número (ou alteração do número) de animais por gaiola, camas, temperatura e humidade relativa ambientes, fotoperíodo e dieta,
- espécie e estirpe utilizadas e, caso não sejam utilizados ratos, justificação da utilização de outra espécie. Podem apresentar-se dados originários da proveniência dos animais ou dados históricos, desde que correspondentes a animais sujeitos às mesmas condições de exposição, alojamento e jejum,
- número, idade e sexo,
- método de aleatorização,
- descrição de eventuais condicionamentos anteriores ao ensaio, nomeadamente ao nível da dieta, de quarentenas e do tratamento de doenças.

##### *Produto químico em estudo*

- natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas pertinentes (incluindo a isomerização),
- dados de identificação e, se for conhecido, número de registo CAS (*Chemical Abstract Service*).

##### *Veículo*

- justificação da utilização e da escolha do veículo (se não for água),
- dados históricos ou paralelos demonstrativos de que o veículo não interfere nos resultados do estudo.

*Câmaras de inalação*

- descrição pormenorizada – incluindo o volume e um esquema – das câmaras de inalação,
- origem e descrição do equipamento utilizado na exposição dos animais e na geração da atmosfera,
- equipamento de medição da temperatura, humidade, granulometria e concentração real,
- fonte de ar e sistema de climatização utilizado,
- métodos utilizados para calibrar o equipamento a fim de garantir a homogeneidade da atmosfera ensaiada,
- subpressão ou sobrepressão,
- pontos de exposição por câmara (de exposição unicamente nasal); localização dos animais na câmara (câmara de exposição de corpo inteiro),
- estabilidade da atmosfera ensaiada,
- localização nas câmaras dos sensores térmicos e higrométricos e dos pontos de colheita de amostras da atmosfera ensaiada,
- tratamento do ar fornecido/evacuado,
- caudais de ar, caudal de ar em cada ponto de exposição (exposição unicamente nasal) ou relação entre o volume ocupado pelos animais e o volume da câmara (câmara de exposição de corpo inteiro),
- tempo necessário para as câmaras de inalação atingirem o equilíbrio ( $t_{95}$ ),
- número horário de substituições de volume,
- medidores (se existirem).

*Elementos relativos à exposição*

- fundamentação da escolha da concentração visada no estudo principal,
- concentrações nominais (dadas pela divisão da massa do produto químico em estudo introduzido na câmara de inalação pelo volume de ar total que nela circulou),
- concentrações reais do produto químico em estudo obtidas na zona de respiração dos animais; no caso das misturas que geram formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerossóis), pode analisar-se separadamente cada uma delas,
- as concentrações no ar devem indicar-se em unidades de massa (mg/l, mg/m<sup>3</sup>, etc.) e não de volume (ppm, ppb, etc.),
- distribuição granulométrica, diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) e desvio-padrão geométrico ( $\sigma_g$ ), incluindo os métodos de cálculo correspondentes; indicar também o resultado de cada análise granulométrica efetuada.

*Condições de realização dos ensaios*

- elementos sobre a preparação do produto químico estudado, nomeadamente sobre eventuais métodos de redução da granulometria de sólidos ou de preparação de soluções do produto químico,
- descrição (de preferência complementada por um esquema) do equipamento utilizado para gerar a atmosfera ensaiada e para expor os animais a essa atmosfera,
- elementos relativos ao equipamento de monitorização da temperatura, humidade e caudal de ar nas câmaras (curvas de calibração),
- elementos relativos ao equipamento utilizado para colher as amostras para determinação da granulometria e da concentração nas câmaras,
- elementos sobre o método de análise química utilizado e sobre a validação desse método (incluindo o rendimento da recuperação do produto químico em estudo do meio amostrado),



- método utilizado para distribuir aleatoriamente os animais pelos grupos ensaiados e pelos grupos de controlo,
- elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),
- fundamentação da escolha das concentrações utilizadas nos ensaios.

#### Resultados

- quadro com a temperatura, a humidade e o caudal de ar nas câmaras,
- quadro com as concentrações nominais e reais nas câmaras,
- quadro com os dados granulométricos, nomeadamente dados analíticos sobre a colheita de amostras, a distribuição granulométrica e os cálculos de MMAD e  $\sigma_g$ ,
- quadro com os dados de resposta e as concentrações correspondentes a cada animal (animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, e natureza, intensidade, momento do aparecimento e duração dos efeitos),
- quadro com os pesos de cada animal,
- quadro dos consumos alimentares,
- quadro dos dados de patologia clínica,
- resultados da autópsia e resultados histopatológicos correspondentes a cada animal, se disponíveis.

#### Discussão e interpretação dos resultados

- deve ser dada especial atenção à descrição dos métodos utilizados para satisfazer os critérios deste método de ensaio, nomeadamente no que respeita à concentração-limite e à granulometria,
- examinar em que medida, com base nos resultados globais, as partículas são respiráveis, em especial se os critérios granulométricos não forem satisfeitos,
- a apreciação global do estudo deve incidir igualmente na coerência dos métodos utilizados para determinar as concentrações nominal e real e deve dar conta da relação entre estas concentrações,
- referir a causa provável da morte e o modo de ação predominante (sistémico ou local),
- explicar por que razão terá sido necessário eutanasiar animais que apresentavam sinais de dor ou de grande sofrimento continuado, com base nos critérios do documento de orientações da OCDE relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (3);
- identificar o(s) órgão(s)-alvo,
- determinar o NOAEL e o LOAEL (nível mínimo com observação de efeitos adversos).

#### REFERÊNCIAS:

- (1) OCDE (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*. Original Test Guideline No. 413. Environment Directorate, OCDE, Paris.
- (2) OCDE (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.
- (3) OCDE (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.
- (4) Whalan J.E., Redden J.C. (1994). *Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies*. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

- 
- (5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Capítulo 9), in *Toxicology of Inhaled Material*. Witschi, H.P., Brain, J.D. (eds.). Springer Verlag Heidelberg, p. 229-258.
  - (6) Young J.T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1:309-312.
  - (7) Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ. Health Perspect.* 85:231-238.
  - (8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In Waalkes M.P., Ward J.M. (eds.) *Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series*, Raven Press, New York, 215-263.
  - (9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22:353-372.
  - (10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hamelers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13:219-224.
  - (11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141:281-285.
  - (12) Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3):419-428.
  - (13) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).
-

## Apêndice 1

## DEFINIÇÃO

**Produto químico em estudo:** qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

## B.30. ESTUDOS DE TOXICIDADE CRÓNICA

## INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline 452* (2009) da OCDE. O *Test Guideline 452* (TG 452) inicial foi adotado em 1981. Entendeu-se necessário rever o método B.30 para dar conta da evolução recente no domínio do bem-estar animal e da regulamentação (1)(2)(3)(4). A atualização do método B.30 decorreu paralelamente à revisão dos capítulos B.32 ("Estudos de carcinogenicidade") e B.33 ("Estudos combinados de toxicidade crónica e carcinogenicidade") deste anexo. Visa-se obter mais dados a partir dos animais utilizados nos estudos e dispor de mais elementos para a escolha das doses. Este método foi concebido para o ensaio de uma vasta gama de produtos químicos, nomeadamente pesticidas e produtos químicos industriais.
2. Na sua maioria, os estudos de toxicidade crónica são efetuados em roedores. Este método destina-se, portanto, a ser aplicado, preferencialmente, a estudos em espécies de roedores. Caso seja necessário efetuar estudos noutras espécies, os princípios e procedimentos descritos neste método e no capítulo B.27 deste anexo — "Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias" (5) — podem igualmente ser aplicados, com as adaptações necessárias descritas no *Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (n.º 116) da OCDE (6).
3. As três vias principais de administração nos estudos de toxicidade crónica são a via oral, a via dérmica e a via inalatória. A via de administração escolhida depende das características físico-químicas do produto químico em estudo e da via predominante de exposição humana. O documento de orientações n.º 116 da OCDE (6) contém mais informações sobre a escolha da via de exposição.
4. Este método centra-se na exposição por via oral, que é a via habitualmente mais utilizada nos estudos de toxicidade crónica. Embora possa também ser necessário efetuar estudos de toxicidade crónica a longo prazo por via dérmica ou por inalação para avaliar o risco para a saúde humana e/ou isso possa mesmo ser exigido pela regulamentação aplicável, estas duas vias de exposição são bastante complexas do ponto de vista técnico e esses estudos têm de ser concebidos para cada caso concreto. Porém, no que diz respeito às recomendações relativas aos períodos de exposição, aos parâmetros clínicos e patológicos e a outros aspetos, o método aqui descrito para caracterização e avaliação da toxicidade crónica por administração oral pode constituir a base de um protocolo para estudos por inalação e/ou por via dérmica. A OCDE publicou orientações relativas ao estudo da administração de produtos químicos por inalação (6)(7) e por via dérmica (6). Para a conceção de estudos a longo prazo com exposição por via inalatória, recomenda-se especificamente a consulta dos capítulos B.8 (8) e B.29 (9) deste anexo e do documento de orientações da OCDE relativo a ensaios de toxicidade aguda por inalação (7). No caso dos ensaios por via dérmica, deve consultar-se o capítulo B.9 (10) deste anexo.
5. Os estudos de toxicidade crónica fornecem informações sobre os perigos para a saúde que potencialmente podem advir da exposição repetida durante um período considerável do tempo de vida da espécie utilizada. Estes estudos fornecem informações sobre os efeitos tóxicos do produto químico em causa, os órgãos afetados e a possibilidade de acumulação. Podem igualmente servir para obter uma estimativa do nível sem observação de efeitos adversos ("*no observed adverse effect level*", NOAEL), com base na qual se podem estabelecer critérios de segurança para a exposição humana. Salienta-se a necessidade de um exame clínico cuidadoso dos animais, de modo a obter-se o máximo de informação possível.
6. Entre os objetivos dos estudos efetuados por este método contam-se os seguintes:
  - identificação da toxicidade crónica de produtos químicos,
  - identificação de órgãos afetados,
  - caracterização de relações dose-resposta,
  - determinação de níveis sem observação de efeitos adversos (NOAEL) ou ponto de partida para o estabelecimento de doses de referência,
  - previsão de efeitos de toxicidade crónica aos níveis da exposição humana,
  - obtenção de dados para verificação de hipóteses relativas a modos de ação (6).

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. Antes de efetuar um estudo com vista à caracterização e avaliação de um produto químico do ponto de vista toxicológico, o laboratório que efetuará os ensaios deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa, a fim de adaptar o estudo de modo a melhorar a eficiência da determinação do potencial de toxicidade crónica e para minimizar o recurso a animais. Entre os elementos que podem ser úteis na conceção do estudo contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em causa, informações disponíveis sobre o modo de ação, resultados de ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana, dados (Q)SAR — "*quantitative structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins, dados toxicocinéticos disponíveis (dados cinéticos associados a uma dose única ou a doses múltiplas) e dados provenientes de outros estudos com exposição repetida. Só deve proceder-se à determinação da toxicidade crónica depois de obtidos dados de toxicidade preliminares provenientes de estudos de toxicidade com repetição da dose administrada durante 28 e/ou 90 dias. Deve ponderar-se uma abordagem faseada dos ensaios de toxicidade crónica no âmbito da avaliação global dos potenciais efeitos adversos na saúde do produto químico em estudo (11)(12)(13)(14).
8. Antes de iniciar o estudo, devem escolher-se, com base no plano experimental e nos objetivos estabelecidos, os métodos estatísticos mais adequados para a análise dos resultados. Entre outros aspetos a considerar, é necessário determinar se o tratamento estatístico deverá contemplar ajustamentos em função do grau de sobrevivência e que tipo de análise deve efetuar-se no caso da morte prematura de todos os animais de um ou mais grupos. Para orientações sobre as análises estatísticas mais adequadas e informação sobre as referências bibliográficas fundamentais dos métodos estatísticos internacionalmente reconhecidos, deve consultar-se o documento de orientações n.º 116 (6), assim como o documento de orientações n.º 35, relativo à análise e avaliação de estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (15).
9. Ao realizar um estudo de toxicidade crónica, recomenda-se que sejam sempre seguidos os princípios e considerações orientadoras enunciados no *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (n.º 19) da OCDE (16), nomeadamente os expressos no ponto 62 do mesmo, cuja tradução é a seguinte: *Nos estudos com repetição da dose administrada, se um animal evidenciar sinais clínicos progressivos da deterioração do seu estado, deve tomar-se uma decisão com conhecimento de causa sobre se deve ou não ser eutanasiado. Para isso, deve ponderar-se, nomeadamente, o valor das informações que seriam obtidas no caso de o animal continuar integrado no estudo, relativamente ao estado geral do mesmo. Caso se decida manter o animal no estudo, deve aumentar-se, tanto quanto necessário, a frequência dos exames que lhe são efetuados. Também é possível, sem prejudicar a finalidade do ensaio, suspender temporariamente a administração do produto químico em estudo — se isso reduzir a dor ou o sofrimento do animal — ou reduzir a dose administrada.*
10. Para orientações pormenorizadas sobre os princípios aplicáveis à escolha das doses para estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade e uma discussão dos mesmos, recomenda-se a consulta do documento de orientações n.º 116 (6) e das publicações com as referências 17 e 18 do International Life Sciences Institute. A estratégia de base para escolha das doses depende do objetivo ou objetivos principais do estudo (ver o ponto 6). Para escolher doses adequadas, importa estabelecer um equilíbrio entre, por um lado, a identificação dos perigos em jogo e, por outro, a caracterização e importância das respostas às doses reduzidas. Este equilíbrio é especialmente necessário quando se realizam estudos combinados de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo) — ver o ponto 11.
11. Deve ponderar-se a oportunidade de efetuar um estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo), em vez de efetuar separadamente um estudo de toxicidade crónica (o presente método B.30) e um estudo de carcinogenicidade (capítulo B.32 deste anexo). O estudo combinado é mais favorável, em termos de tempo e de custos, do que dois estudos distintos e não prejudica a qualidade dos dados obtidos na etapa de toxicidade crónica nem na etapa de carcinogenicidade. Ao efetuar um estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo), é, porém, necessário prestar especial atenção aos princípios relativos à escolha das doses (pontos 9 e 20 a 25). Reconhece-se, porém, que determinadas regulamentações podem exigir a realização de estudos separados.
12. No final do capítulo e no documento de orientações n.º 116 (6) definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

## PRINCÍPIO DO MÉTODO

13. Administra-se diariamente o produto químico em estudo a vários grupos de animais, em doses crescentes de grupo para grupo, normalmente durante doze meses, embora possam escolher-se períodos mais longos ou mais curtos em função das exigências da regulamentação (ver o ponto 33). Escolhe-se a duração do estudo de modo a ser suficientemente longa para que os eventuais efeitos de toxicidade acumulada se manifestem, mas sem que sejam perturbados por alterações ligadas ao envelhecimento dos animais. Se o período de exposição não for de doze meses, é necessário fundamentá-lo, sobretudo se a duração da exposição for mais curta. Normalmente, administra-se o produto químico por via oral, embora a via inalatória ou a via dérmica também possam ser adequadas. Pode estar prevista a realização de uma ou mais eutanásias intercalares, por exemplo, após três ou seis meses. Nesse caso, pode aumentar-se o número de grupos de animais em conformidade (ver o ponto 19). No decurso do período de administração do produto químico, deve verificar-se atentamente se os animais evidenciam sinais de toxicidade. Autopsia-se os animais que morrem ou são eutanasiados durante os ensaios. No final dos ensaios, eutanasiam-se e autopsia-se os animais sobreviventes.

## DESCRIÇÃO DO MÉTODO

### Escolha da espécie animal

- Este método trata, em especial, da caracterização e avaliação da toxicidade crónica em roedores (ver o ponto 2), embora determinadas regulamentações exijam estudos similares em não roedores. É necessário justificar a escolha da espécie. Se forem exigidos estudos de toxicidade crónica em espécies que não sejam de roedores, a conceção e realização desses estudos deve basear-se nos princípios descritos no presente método e no capítulo B.27 deste anexo – "Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias" (5). O documento de orientações n.º 116 (6) contém mais informações sobre a escolha da espécie e da estirpe.
- Embora neste método se possa recorrer a outros roedores, como o ratinho, a espécie preferida é o rato. O rato e o ratinho constituem os modelos experimentais preferidos devido à sua longevidade relativamente reduzida, à sua utilização generalizada em estudos farmacológicos e toxicológicos, à sua sensibilidade à indução de tumores e à disponibilidade de estirpes suficientemente caracterizadas destas espécies. Em consequência disto, dispõe-se de numerosos dados sobre a fisiologia e patologia destes animais. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. O estudo de toxicidade crónica deve ser realizado com animais da mesma estirpe e proveniência que os utilizados no estudo ou estudos preliminares mais curtos. As fêmeas utilizadas devem ser núlparas e não podem estar grávidas.

### Condições de alojamento e alimentação

- Os animais podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo. É necessário justificar cientificamente a opção pelo alojamento individual (19)(20)(21). As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 30 %, no mínimo, e um valor máximo que, preferencialmente, não deve exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições. A dieta deve satisfazer as necessidades nutricionais da espécie estudada. Os teores de contaminantes da dieta – resíduos de pesticidas, poluentes orgânicos persistentes, fitoestrogénios, metais pesados, micotoxinas e outros – podem influenciar os resultados dos ensaios e devem ser os mais baixos possíveis. É necessário obter periodicamente dados analíticos relativos aos teores de nutrientes e de contaminantes da dieta, pelo menos no início do estudo e quando se muda de lote. Estes dados devem constar do relatório final. É igualmente necessário dispor de dados analíticos da água de beber utilizada no estudo. Quando o produto químico em estudo é administrado por via alimentar, a escolha da dieta pode ser influenciada pela necessidade de nela misturar convenientemente esse produto químico e de satisfazer simultaneamente as exigências nutricionais dos animais.

### Preparação dos animais

- Os animais utilizados devem ser saudáveis e ter sido aclimatados às condições laboratoriais durante, pelo menos, sete dias e não devem ter participado em experiências anteriores. No caso dos roedores, a administração do produto químico em estudo deve iniciar-se logo que possível após o desmame e a aclimação, de preferência antes de os animais completarem oito semanas. É necessário caracterizar a espécie, a estirpe, a proveniência, o sexo, o peso e a idade dos animais utilizados no estudo. No início do estudo, as diferenças de peso entre os animais de cada sexo devem ser mínimas, não se desviando mais de 20 % do peso médio de todos os animais de cada sexo nele utilizados. Distribuem-se aleatoriamente os animais pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. Depois da distribuição aleatória dos animais, a média de peso corporal não deve diferir significativamente de grupo para grupo de animais do mesmo sexo. Se houver diferenças com significado estatístico, os animais devem, se possível, ser redistribuídos aleatoriamente. Deve atribuir-se a cada animal um número de identificação único, com o qual o animal seja identificado por tatuagem, implantação de *microchip* ou outro método adequado.

## PROCEDIMENTO

### Número e sexo dos animais

- Devem ser utilizados animais de ambos os sexos. O número de animais utilizados deve ser suficiente para que, no final do estudo, reste em cada grupo um número de animais que permita efetuar uma avaliação biológica e estatística aprofundada. Caso se utilizem roedores, normalmente cada grupo do mesmo sexo exposto a cada dose deve integrar, pelo menos, 20 animais; caso não se utilizem roedores, recomenda-se que o número mínimo seja de quatro animais do mesmo sexo por grupo, para cada dose. Nos estudos em ratinhos, pode ser necessário reforçar o número de animais em cada grupo, para cada dose, para poder realizar todas as determinações hematológicas previstas.

### Eutanásias intercalares, grupos satélites e animais sentinelas

- Caso se justifique do ponto de vista científico, pode prever-se a realização de eutanásias intercalares (pelo menos dez animais de cada grupo, de cada um dos sexos), por exemplo, ao fim de seis meses, para obter informações sobre a evolução das alterações toxicológicas, bem como dados mecanísticos. Caso já se disponha desses dados, obtidos em estudos de toxicidade por dose repetida realizados com o produto químico em causa, as eutanásias em questão podem não se justificar cientificamente. Podem também prever-se grupos satélites para verificar a reversibilidade de alterações toxicológicas induzidas pelo produto químico em estudo. Nesse caso, os grupos

satélites restringir-se-ão, normalmente, à dose mais elevada em estudo e aos grupos de controlo. Pode ainda prever-se um grupo de animais sentinelas (habitualmente cinco animais de cada sexo) para verificar, se necessário, o aparecimento de doenças durante o estudo (22). Caso esteja prevista a realização de eutanásias intercalares ou a inclusão de grupos satélites ou sentinelas, o número de animais a utilizar no estudo deve ser aumentado no número de animais a eutanasiar antes do termo do mesmo. Normalmente, os animais em causa devem ser objeto dos mesmos exames, nomeadamente peso corporal, consumo de alimentos e de água, análises hematológicas e de química clínica e exames patológicos, que os animais participantes na etapa de toxicidade crónica do estudo principal, embora também possa prever-se (no caso dos grupos com destino a eutanásia intercalar) que as determinações se limitem a parâmetros fundamentais específicos, por exemplo, de neurotoxicidade ou de imunotoxicidade.

#### Grupos de dose e dosagens

20. O documento de orientações n.º 116 (6) contém orientações relativas a todos os aspetos relacionados com a escolha das doses e os intervalos entre estas. Devem ser utilizados, pelo menos, três doses e um controlo em paralelo, exceto nos casos em que se realiza um ensaio do limite (ver o ponto 27). As doses baseiam-se, normalmente, nos resultados de estudos exploratórios das doses ou de estudos de dose repetida por períodos mais curtos e devem atender aos dados toxicológicos e toxicocinéticos disponíveis sobre o produto químico em estudo ou produtos químicos afins.
21. A menos que tal dose esteja limitada pelas características físico-químicas ou pelos efeitos biológicos do produto químico em estudo, normalmente escolhe-se para dose mais elevada o nível que permita identificar os principais órgãos afetados e os efeitos tóxicos principais sem causar sofrimento, efeitos tóxicos intensos, morbidez nem mortalidade. Tendo presente o referido no ponto 22, deve escolher-se para dose mais elevada uma dose que induza efeitos tóxicos, evidenciados, por exemplo, por uma redução (aproximadamente de 10 %) do ganho de peso corporal.
22. Todavia, consoante os objetivos do estudo (ver o ponto 6), pode escolher-se uma dose máxima inferior à que evidencia efeitos tóxicos, por exemplo, se essa dose induzir um efeito adverso preocupante, mas com pouca influência na longevidade ou no peso corporal dos animais. A dose máxima não deve exceder 1 000 mg por quilograma de peso corporal por dia (relativamente à dose-limite, ver o ponto 27).
23. Podem escolher-se doses e intervalos entre doses que permitam estabelecer uma relação dose-resposta e determinar um NOAEL ou outro resultado pretendido do estudo, por exemplo, uma dose de referência (ver o ponto 25) ao nível de dose mais baixo. Entre os fatores a ter em conta na escolha das doses mais baixas, contam-se o declive esperado da curva dose-resposta, as doses às quais podem ocorrer alterações importantes ao nível metabólico ou do modo da ação tóxica, o nível ao qual se prevê a ocorrência de um limiar e o nível ao qual se prevê fixar o ponto de partida de extrapolações para doses mais baixas.
24. O intervalo entre as doses depende das características do produto químico em estudo e não pode ser prescrito neste método. Contudo, a utilização de intervalos definidos por um fator de 2 a 4 entre doses consecutivas dá frequentemente bons resultados nestes ensaios, sendo muitas vezes melhor ensaiar um quarto grupo do que recorrer a intervalos muito grandes (por exemplo, mais do que um fator de 6 a 10) entre as dosagens. Em geral, são de evitar fatores superiores a 10. Caso contrário, é necessário justificá-los.
25. Conforme se explica mais em pormenor no documento de orientações n.º 116 (6), entre os aspetos a ter em conta na escolha das doses contam-se os seguintes:
  - relações não lineares ou pontos de inflexão conhecidos ou de que se suspeite na curva dose-resposta,
  - aspetos toxicocinéticos e doses às quais ocorra, ou não ocorra, indução metabólica, saturação ou não linearidade entre as doses externas e as doses internas,
  - lesões precursoras, marcadores de efeitos ou indicadores de processos biológicos fundamentais subjacentes em curso,
  - aspetos fundamentais (ou de que se suspeite) do modo de ação, tais como as doses às quais começam a manifestar-se efeitos citotóxicos, os níveis hormonais são perturbados, os mecanismos homeostáticos colapsam, etc.,
  - regiões da curva dose-resposta que necessitam de estimativas especialmente rigorosas, por exemplo, perto da dose de referência prevista ou da dose à qual se suspeite corresponder um limiar,
  - níveis previstos de exposição humana.
26. O grupo de controlo deve ser um grupo não exposto ao produto químico em estudo ou, se for usado um veículo para administrar o produto químico, um grupo de controlo do veículo. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos ensaiados. Caso se utilize um veículo, o grupo de controlo deve receber o volume máximo de veículo utilizado nos grupos expostos ao produto químico em estudo. Se o produto químico for administrado por via da dieta e reduzir significativamente a quantidade desta ingerida por lhe conferir menor palatabilidade, um grupo de controlo adicional alimentado do mesmo modo, em paralelo, pode constituir um grupo de controlo mais adaptado.

27. Se, com base em estudos preliminares, for de prever que o ensaio, realizado de acordo com o presente método, de uma dose equivalente a não menos de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia não provoque efeitos adversos e, tendo em conta dados referentes a produtos químicos estruturalmente afins, não forem de prever efeitos tóxicos, pode considerar-se que não é necessário efetuar um estudo completo com três doses. Nesses casos, pode justificar-se um limite de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia, exceto se os dados relativos à exposição humana aconselharem o ensaio de doses superiores.

#### **Preparação das doses e administração do produto químico em estudo**

28. O produto químico em estudo é normalmente administrado por via oral, através da dieta ou da água de beber ou por intermédio de uma sonda esofágica. O documento de orientações n.º 116 (6) contém mais informações sobre vias e métodos de administração. A via e o método de administração dependem do objetivo do estudo, bem como das propriedades físico-químicas e biodisponibilidade do produto químico em causa e da via e do método de exposição humana predominantes. É necessário fundamentar a via e o método de administração escolhidos. Por razões de bem-estar animal, normalmente só deve optar-se pela utilização de uma sonda esofágica no caso dos agentes relativamente aos quais a via oral e este método de administração representem razoavelmente a exposição humana potencial (por exemplo, através da ingestão de produtos farmacêuticos). No caso dos produtos químicos ingeridos com os alimentos ou disseminados no ambiente, nomeadamente pesticidas, a administração habitual é por incorporação na dieta ou na água de beber. Todavia, para outros cenários — caso da exposição profissional —, pode justificar-se a administração por outras vias.
29. Se necessário, pode suspender-se ou dissolver-se o produto químico em estudo num veículo apropriado. Devem ser tidos em conta as seguintes características que se justifiquem do veículo e de outros aditivos: efeitos na absorção, na distribuição, no metabolismo ou na retenção do produto químico em estudo, efeitos nas propriedades químicas do produto químico em causa suscetíveis de alterarem as características tóxicas do mesmo e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais. Recomenda-se que, sempre que possível, a primeira opção seja uma solução ou suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode optar-se por uma solução ou emulsão num óleo (por exemplo, em óleo de milho); em último caso, poderá recorrer-se a uma solução noutra veículo. Se o veículo utilizado não for água, é necessário conhecer as suas características de toxicidade. Deve dispor-se de informações sobre a estabilidade do produto químico em estudo e a homogeneidade das soluções ou rações de dosagem (consoante o caso) nas condições de administração (por exemplo, por via da dieta).
30. É importante assegurar que a quantidade de um produto químico em estudo administrada através da dieta ou da água de beber não interfere nas exigências normais de nutrição nem no equilíbrio hídrico. No caso dos estudos de toxicidade a longo prazo nos quais o produto químico seja administrado pela via alimentar, a concentração deste nos alimentos não deve, normalmente, exceder 5 % da ração total, a fim de evitar desequilíbrios nutricionais. Se o produto químico em estudo for administrado por via da dieta, pode optar-se por concentrações constantes nesta (mg/kg de alimentos ou ppm) ou por doses constantes em relação ao peso corporal do animal (mg/kg de peso corporal), calculadas semanalmente. Deve indicar-se a opção tomada.
31. Em caso de administração por via oral, os animais recebem uma dose quotidiana (sete dias por semana) do produto químico em estudo, normalmente durante doze meses (ver também o ponto 33), embora possa ser necessário um período mais longo, em função das exigências da regulamentação. É necessário justificar qualquer outro regime de dosagem (por exemplo, cinco dias por semana). Em caso de administração por via dérmica, os animais são normalmente expostos ao produto químico em estudo durante, pelo menos, seis horas por dia, sete dias por semana, conforme se descreve no capítulo B.9 (10) deste anexo, ao longo de doze meses. A exposição por via inalatória é efetuada durante seis horas por dia, sete dias por semana. Todavia, caso se justifique, também podem expor-se os animais durante cinco dias por semana. O período de exposição neste caso é normalmente de doze meses. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Se a duração da exposição for inferior a seis horas por dia, é necessário fundamentá-lo. Ver também o capítulo B.8 (8) deste anexo.
32. A administração do produto químico aos animais por meio de uma sonda esofágica deve efetuar-se à mesma hora do dia por meio de um tubo estomacal ou de uma cânula de intubação adequada. Normalmente, administra-se a dose diária de uma só vez. Porém, se o produto químico for, por exemplo, um irritante local, pode repartir-se a mesma dose diária por dois momentos. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal e deve ser o mínimo possível. No caso dos roedores, normalmente não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal (22). Para minimizar diferenças entre volumes administrados, devem ser efetuados ajustes nas concentrações, de forma que o volume seja o mesmo para todas as doses. Excetuam-se os produtos químicos potencialmente corrosivos ou irritantes, que têm de ser diluídos para evitar efeitos locais intensos. Devem evitar-se concentrações que possam provocar efeitos corrosivos ou irritantes no tubo digestivo.

#### **Duração do estudo**

33. Embora este método tenha sido preferencialmente concebido para estudos de toxicidade crónica com a duração de doze meses, também está adaptado e pode aplicar-se a estudos mais curtos (por exemplo, 6 ou 9 meses) ou mais longos (por exemplo, 18 ou 24 meses), consoante o exija a regulamentação pertinente ou por razões mecánicas determinadas. Se o período de exposição não for de doze meses, é necessário fundamentá-lo, sobretudo se a duração da exposição for mais curta. Os grupos satélites incluídos para verificar a reversibilidade de alterações toxicológicas induzidas pelo produto químico em estudo devem manter-se sem dosagem após o termo da exposição, durante um período não inferior a quatro semanas e não superior a um terço da duração total do estudo. O documento de orientações n.º 116 (6) contém mais orientações, nomeadamente em matéria de sobrevivência dos animais no estudo.

## EXAMES

34. Normalmente no início e no final de cada dia, incluindo fins de semana e feriados, devem verificar-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais. Pelo menos uma vez por dia, deve efetuar-se um exame clínico geral, de preferência sempre à(s) mesma(s) hora(s) e, no caso da administração por sonda esofágica, tendo em conta o período previsto de efeitos mais acentuados após a administração do produto químico.
35. Deve efetuar-se um exame clínico aprofundado a cada animal pelo menos uma vez antes da primeira exposição (para poder fazer depois comparações com o estado inicial do animal), no final da primeira semana do estudo e, a partir daí, mensalmente. Os exames devem respeitar um protocolo que minimize as variações entre quem os realiza e não faça depender os resultados do grupo examinado. Estes exames devem ser realizados fora das gaiolas, de preferência num recinto normalizado e sempre à mesma hora. Os resultados destes exames devem ser cuidadosamente registados, de preferência por recurso a um sistema de pontuação claramente definido pelo laboratório em causa. Deve zelar-se por que as condições de exame sejam o mais constantes possível. Entre os sinais a registar contam-se alterações da pele, da pelagem, dos olhos e das mucosas e a ocorrência de secreções, excreções ou reações neurovegetativas (por exemplo, lacrimação, horripilação, alterações da dimensão pupilar ou respiração anormal). Deve também registar-se qualquer alteração da maneira de o animal se mover, da postura e da reação à manipulação, bem como a ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e de comportamentos estereotipados (por exemplo, atos de higiene repetitivos ou movimentação repetitiva em círculo) ou estranhos (automutilação, movimentação para trás, etc.) (24).
36. Recorrendo a um oftalmoscópio ou a dispositivo equivalente, efetua-se um exame oftalmológico a cada animal antes da primeira administração do produto químico em estudo. No termo do estudo, deve efetuar-se este exame de preferência a todos os animais, mas pelo menos aos dos grupos expostos à dose mais elevada e dos grupos de controlo. Se forem detetadas alterações oculares atribuíveis à exposição ao produto químico em estudo, devem examinar-se todos os animais. Se a análise estrutural ou outros elementos indicarem efeitos tóxicos ao nível ocular, deve aumentar-se a frequência dos exames oculares.
37. No caso dos produtos químicos que tenham revelado potencial de indução de efeitos neurotóxicos em estudos anteriores de toxicidade por dose repetida a 28 dias e/ou a 90 dias, poderá, a título facultativo, verificar-se a reatividade sensorial a diversos tipos de estímulos (24) — por exemplo, estímulos auditivos, visuais ou proprioceptivos (25)(26)(27) — e avaliar-se a força de prensão (28) e a atividade motora (29), antes de iniciar o estudo e, a partir daí, de três em três meses, até aos doze meses, inclusive, bem como no termo do estudo (se for além de doze meses). As referências indicadas contêm mais informações sobre a maneira de proceder em cada caso, embora possam adotar-se procedimentos distintos dos nelas descritos.
38. No caso dos produtos químicos que tenham revelado potencial de indução de efeitos imunotóxicos em estudos anteriores de toxicidade por dose repetida a 28 dias e/ou a 90 dias, poderá, a título facultativo, aprofundar-se a investigação deste parâmetro no termo do estudo.

**Peso corporal, consumo de alimentos e de água, eficiência alimentar**

39. Todos os animais devem ser pesados no início da exposição, pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Deve medir-se o consumo de alimentos e a eficiência alimentar pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, deve medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Pode ser útil medir o consumo de água também no caso dos estudos em que se verifiquem alterações do comportamento dos animais a esse nível.

**Análises hematológicas e de bioquímica clínica**

40. Nos estudos com roedores, devem ser efetuadas análises hematológicas a, pelo menos, dez machos e dez fêmeas de cada grupo, aos três, seis e 12 meses e no termo do estudo (se for além de 12 meses), sempre aos mesmos animais. No caso dos ratinhos, a realização das análises hematológicas necessárias pode exigir o recurso a animais satélites (ver o ponto 18). No caso dos estudos em que não sejam utilizados roedores, colhem-se amostras num número mais reduzido de animais (por exemplo, se a espécie utilizada for o cão, quatro animais de cada sexo, por grupo) em estádios intermédios e no termo do estudo, tal como se indicou para os roedores. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros hematológicos, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses, tanto no caso dos roedores como de outras espécies. As amostras de sangue devem ser colhidas, sob anestesia, num ponto determinado a indicar, por exemplo, por punção cardíaca ou no seio retro-orbital.
41. Devem ser efetuadas as seguintes análises (30): contagem total de leucócitos, fórmula leucocitária, contagem de eritrócitos, contagem de plaquetas, concentração de hemoglobina, hematócrito (volume celular sanguíneo após centrifugação), volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada. Se necessário, em função da toxicidade do produto químico em estudo, poderão analisar-se outros parâmetros hematológicos, tais como os corpos de Heinz e outras anomalias morfológicas dos eritrócitos ou a meta-hemoglobina. Em termos gerais, deve adotar-se uma perspetiva de flexibilidade, dependendo dos efeitos observados e/ou previstos do produto químico em causa. Se este tiver efeitos no sistema hematopoético, pode ser útil efetuar também a contagem de reticulócitos e uma citologia da medula óssea, embora estas análises não sejam sistematicamente necessárias.



42. Com a cronologia especificada para as análises hematológicas e colhendo as amostras de sangue sempre nos mesmos animais — pelo menos dez machos e dez fêmeas de cada grupo —, devem ser efetuadas análises de bioquímica clínica para determinar os principais efeitos tóxicos nos tecidos, nomeadamente ao nível dos rins e do fígado. No caso dos ratinhos, a realização das necessárias análises de bioquímica clínica pode exigir o recurso a animais satélites. No caso dos estudos em que não sejam utilizados roedores, colhem-se amostras num número mais reduzido de animais (por exemplo, se a espécie utilizada for o cão, quatro animais de cada sexo, por grupo) em estádios intermédios e no termo do estudo, tal como se indicou para os roedores. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros de bioquímica clínica, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses, tanto no caso dos roedores como de outras espécies. Recomenda-se o jejum dos animais (exceto dos ratinhos) durante a noite, antes da colheita das amostras de sangue. Devem ser efetuadas as seguintes análises (30): glucose, ureia (azoto ureico), creatinina, proteínas totais, albumina, cálcio, sódio, potássio, colesterol total, pelo menos duas análises reveladoras de efeitos hepatocelulares (alanina-aminotransferase, aspartato-aminotransferase, glutamato-desidrogenase, ácidos biliares totais) (31) e, pelo menos, duas análises reveladoras de efeitos hepatobiliares (fosfatase alcalina, gama-glutamil-transferase, 5'-nucleotidase, bilirrubina total, ácidos biliares totais) (31). Se necessário, em função da toxicidade do produto químico em estudo, poderão analisar-se outros parâmetros de química clínica, tais como a colinesterase, hormonas específicas e os triglicéridos em jejum. Em termos gerais, deve adotar-se uma perspetiva de flexibilidade, dependendo dos efeitos observados e/ou previstos do produto químico em causa.
43. Devem ser efetuadas análises de urina a, pelo menos, dez machos e dez fêmeas de cada grupo, em amostras colhidas com a cronologia especificada para as análises hematológicas e de química clínica. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros analisados na urina, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses. Uma recomendação de peritos relativa a estudos de patologia clínica (30) inclui a seguinte lista de parâmetros: aspeto, volume, osmolaridade ou densidade, pH, proteínas totais e glucose. Podem também determinar-se os seguintes parâmetros: corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e sangue oculto. Pode ser necessário recorrer ainda a outros parâmetros para investigar melhor os efeitos observados.
44. Em geral, considera-se que, nos estudos em cães, é necessário dispor dos valores de base dos parâmetros hematológicos e de bioquímica clínica antes de iniciar a exposição dos animais, o mesmo não sucedendo, porém, no caso dos estudos em roedores (30). Se os dados de base históricos (ver o ponto 50) forem inadequados, pode, no entanto, ser necessário determinar os dados em falta.

### Patologia

#### *Autópsia macroscópica*

45. Normalmente, deve ser realizada a todos os animais estudados uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Todavia, pode igualmente prever-se que (no caso dos grupos com destino a eutanásia intercalar e dos grupos satélites) as determinações se limitem a parâmetros fundamentais específicos, por exemplo, de neurotoxicidade ou de imunotoxicidade (ver o ponto 19). Não é necessário autopsiar esses animais nem aplicar-lhes os procedimentos descritos nos pontos seguintes. Fica ao critério do diretor do estudo decidir em que casos é necessário autopsiar animais sentinelas.
46. Deve determinar-se o peso dos órgãos de cada animal, com exceção dos excluídos no ponto 45. Removem-se convenientemente todos os tecidos aderentes às glândulas suprarrenais, ao encéfalo, aos epidídimos, ao coração, aos rins, ao fígado, aos ovários, ao baço, aos testículos, à tiroide (com as glândulas paratiroides, sendo a pesagem efetuada depois da fixação) e ao útero de todos os animais (exceto os moribundos e os que sejam eutanasiados durante o estudo) e pesa-se cada um destes ainda húmido o mais rapidamente possível depois da dissecação, para evitar que seque. Nos estudos em ratinhos, a pesagem das glândulas suprarrenais é facultativa.
47. Os tecidos a seguir indicados devem conservar-se no meio de fixação mais adequado ao tipo de tecido em causa e ao exame histopatológico previsto (32) — os tecidos entre parênteses retos são facultativos:

todas as lesões macroscópicas	coração	pâncreas	estômago (pré-estômago, estômago glandular)
glândulas suprarrenais	íleo	glândulas paratiroides	[dentes]
aorta	jejuno	nervo periférico	testículos
encéfalo (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/protuberância anelar)	rins	hipófise	timo
cego	glândulas lacrimais (exo-orbitais)	próstata	tiroide
colo do útero	fígado	reto	[língua]

glândulas de coagulação	pulmões	glândulas salivares	traqueia
cólon	gânglios linfáticos (superficiais e profundos)	vesículas seminais	bexiga urinária
duodeno	glândulas mamárias (obrigatório no caso das fêmeas e, nos machos, se for claramente dissecável)	músculo esquelético	útero, incluindo o colo do útero
epidídimo	[vias respiratórias superiores, incluindo o nariz, os cornetos e os seios paranasais]	pele	[ureteres]
olhos (incluindo a retina)	esófago	medula espinal (a três níveis: cervical, mediotorácico e lombar)	[uretra]
[fémur com articulação]	[bolbo olfativo]	baço	vagina
vesícula biliar (exceto no caso do rato)	ovários	[esterno]	secção da medula óssea e/ou uma punção recente de medula óssea
glândulas de Harder			

No caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem ser conservados ambos. Os resultados clínicos e outros podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem ser conservados também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indiquem que serão provavelmente afetados. Nos estudos por via dérmica, os órgãos a conservar são ainda os constantes da lista relativa à exposição por via oral, mas é essencial proceder igualmente à amostragem e à conservação de pele do local onde o produto químico em estudo foi aplicado. Nos estudos por inalação, a lista de tecidos do aparelho respiratório a conservar e a examinar deve seguir as recomendações dos capítulos B.8 (8) e B.29 (9) deste anexo. A lista de outros órgãos e tecidos a examinar neste caso (além dos tecidos do aparelho respiratório a conservar já especificados), é a estabelecida para a exposição por via oral.

#### *Histopatologia*

48. A referência 32 contém orientações sobre as melhores práticas a seguir na realização de estudos de patologias toxicológicas. Os exames histopatológicos devem incidir, no mínimo, no seguinte:

- todos os tecidos dos animais dos grupos de controlo e dos grupos expostos à dose mais elevada,
- todos os tecidos dos animais que morreram ou foram eutanasiados durante o estudo,
- todos os tecidos com anomalias macroscópicas,
- os tecidos dos órgãos-alvo, e os tecidos que revelaram alterações atribuíveis à exposição ao produto químico em estudo nos animais dos grupos expostos à dose mais elevada, de todos os animais de todos os outros grupos expostos a uma dose do produto químico,
- no caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem examinar-se ambos.

#### DADOS E RELATÓRIOS

##### **Dados**

49. Devem ser apresentados dados por animal relativos a todos os parâmetros avaliados. Esses dados devem ainda ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais no início do ensaio, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados, a hora de cada morte ou eutanásia, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, a descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o momento do seu aparecimento e a sua duração e intensidade, o número de animais que apresentaram lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais que apresentaram cada tipo de lesão. Devem constar dos quadros de resumo dos dados as médias e os desvios-padrão (no caso dos dados contínuos) correspondentes aos animais que apresentaram lesões ou efeitos tóxicos, além do grau das lesões.

50. Os dados históricos de controlo podem ser úteis para a interpretação dos resultados do estudo, por exemplo, quando houver indicações de que os dados provenientes dos grupos de controlo em paralelo divergem significativamente de dados recentes referentes a animais de controlo da mesma colónia e da mesma unidade de ensaio. Caso sejam avaliados dados históricos de controlo, estes devem provir do mesmo laboratório, reportar-se a animais da mesma idade e estirpe e ter sido gerados nos cinco anos anteriores ao estudo em causa.
51. Quando pertinente, devem ser avaliados os resultados numéricos por um método estatístico corrente adequado. Os métodos estatísticos e os dados a analisar devem ser escolhidos no planeamento do estudo (ponto 8). Nessa escolha, devem ser previstos os ajustamentos em função do grau de sobrevivência que se revelem necessários.

#### **Relatório dos ensaios**

52. Dados a constar do relatório dos ensaios:

##### *Produto químico em estudo:*

- natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas,
- dados de identificação,
- proveniência,
- número de lote,
- boletim de análises químicas.

##### *Veículo (se for o caso):*

- justificação da escolha do veículo (se não for água).

##### *Animais estudados:*

- espécie e estirpe utilizadas e justificação da opção tomada,
- número, idade e sexo dos animais no início dos ensaios,
- proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.,
- peso de cada animal no início do ensaio.

##### *Condições de realização dos ensaios:*

- fundamentação da via de administração e das doses escolhidas,
- métodos estatísticos utilizados na análise dos dados, se for o caso,
- elementos relativos à formulação do produto químico em estudo/à incorporação do mesmo na dieta fornecida aos animais,
- dados analíticos relativos à concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação,
- via de administração e elementos relativos à administração do produto químico em estudo,
- no caso dos estudos por inalação: exposição unicamente nasal ou de corpo inteiro,
- doses reais (mg/kg de peso corporal/dia) e, se for caso disso, fator de conversão entre a concentração do produto químico em estudo na dieta ou na água de beber (mg/kg ou ppm) e a dose real,
- elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água.

*Resultados (apresentar quadros de resumo dos dados e os dados por animal):*

- dados de sobrevivência,
- pesos corporais e alterações de peso corporal,
- consumo de alimentos, cálculos da eficiência alimentar (se efetuados) e consumo de água (se for caso disso),
- dados das respostas tóxicas em função do sexo e da dose administrada, incluindo os sinais de toxicidade,
- natureza, incidência (e, se quantificada, intensidade) e duração dos sinais clínicos observados (transitórios ou permanentes),
- exame oftalmológico,
- análises hematológicas,
- análises de bioquímica clínica,
- análises de urina,
- resultados dos estudos de neurotoxicidade ou de imunotoxicidade eventualmente efetuados,
- peso corporal terminal,
- peso de cada órgão (e relação com o peso corporal, se for caso disso),
- resultados das autópsias,
- descrição pormenorizada dos resultados histopatológicos resultantes da exposição dos animais ao produto químico em estudo,
- dados de absorção, se disponíveis.

*Tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.*

*Discussão dos resultados, nomeadamente:*

- relações dose-resposta,
- análise dos dados disponíveis sobre modos de ação,
- discussão dos eventuais modelos,
- determinação das doses de referência, do NOAEL e do LOAEL,
- dados históricos de controlo,
- importância para o ser humano.

*Conclusões:*

**REFERÊNCIAS:**

- (1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Roma, 1995). Documento de trabalho interno. Environment Directorate, OCDE, Paris.
- (2) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. *ATLA* 32:163-208.

- (3) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 40:145-191.
- (4) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206:437-445.
- (5) Capítulo B.27 deste anexo, "Ensaio de toxicidade oral subcrónica — Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias".
- (6) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – segunda edição. Series on Testing and Assessment No. 116. Disponível no sítio Web público de *Test Guidelines* da OCDE ([www.oecd.org/env/testguidelines](http://www.oecd.org/env/testguidelines)).
- (7) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.
- (8) Capítulo B.8 deste anexo, "Toxicidade subaguda por inalação: estudo de 28 dias".
- (9) Capítulo B.29 deste anexo, "Toxicidade subcrónica por inalação: Estudo de 90 dias".
- (10) Capítulo B.9 deste anexo, "Toxicidade (dérmica) da dose repetida (28 dias)".
- (11) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36:1-7.
- (12) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36:9-35.
- (13) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36:37-68.
- (14) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36:69-98.
- (15) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies. Series on Testing and Assessment No. 35; Series on Pesticides No. 14. ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.
- (16) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.
- (17) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection. *Critical Reviews in Toxicology* 37(9):729 - 837.
- (18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (19) Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (JO L 276 de 20.10.2010, p. 33).
- (20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

- 
- (22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (23) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.
- (24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (25) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40:999-1 003.
- (26) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9:691-704.
- (27) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108:267-283.
- (28) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1:233-236.
- (29) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13:599-609.
- (30) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29:198-201.
- (31) Documento da EMEA (*draft*) "Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity" (Ref.<sup>a</sup> EMEA/CHMP/SWP/ /a50115/2006).
- (32) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32:126-131.
-

## Apêndice 1

## DEFINIÇÃO

**Produto químico em estudo:** qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.»

6) Os capítulos B.32 e B.33 são substituídos pelos seguintes textos:

## «B.32 ESTUDOS DE CARCINOGENICIDADE

## INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline 451* (2009) da OCDE. O *Test Guideline 451* (TG 451) inicial relativo aos estudos de carcinogenicidade foi adotado em 1981. Entendeu-se necessário rever o método B.32 para dar conta da evolução recente no domínio do bem-estar animal e da regulamentação (2)(3)(4)(5)(6). A atualização do método B.32 decorreu paralelamente à revisão dos capítulos B.30 ("Estudos de toxicidade crónica") e B.33 ("Estudos combinados de toxicidade crónica e carcinogenicidade") deste anexo. Visa-se obter mais dados a partir dos animais utilizados nos estudos e dispor de mais elementos para a escolha das doses. O método B.32 foi concebido para o ensaio de uma vasta gama de produtos químicos, nomeadamente pesticidas e produtos químicos industriais. Alguns aspetos e requisitos podem, porém, ser diferentes no caso dos produtos farmacêuticos (ver o documento de orientações "*Guidance SIB on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals*", publicado pela Conferência Internacional de Harmonização).
2. Na sua maioria, os estudos de carcinogenicidade são efetuados em roedores. Este método destina-se, portanto, a ser aplicado, preferencialmente, a estudos em espécies de roedores. Caso seja necessário efetuar estudos noutras espécies, devem aplicar-se os princípios e procedimentos descritos neste método e no capítulo B.27 deste anexo — "Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias" (6) —, com as adaptações necessárias. Para mais orientações, consultar o documento de orientações n.º 116 da OCDE, relativo à conceção e realização de estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (7).
3. As três vias principais de administração nos estudos de carcinogenicidade são a via oral, a via dérmica e a via inalatória. A via de administração escolhida depende das características físico-químicas do produto químico em estudo e da via predominante de exposição humana. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a escolha da via de exposição.
4. Este método centra-se na exposição por via oral, que é a via habitualmente mais utilizada nos estudos de carcinogenicidade. Embora possa também ser necessário efetuar estudos de carcinogenicidade por via dérmica ou por inalação para avaliar o risco para a saúde humana e/ou isso possa mesmo ser exigido pela regulamentação aplicável, estas duas vias de exposição são bastante complexas do ponto de vista técnico e esses estudos têm de ser concebidos para cada caso concreto. Porém, no que diz respeito às recomendações relativas aos períodos de exposição, aos parâmetros clínicos e patológicos e a outros aspetos, o método aqui descrito para caracterização e avaliação da carcinogenicidade por administração oral pode constituir a base de um protocolo para estudos por inalação e/ou por via dérmica. A OCDE publicou orientações relativas ao estudo da administração de produtos químicos por via dérmica (7) e por inalação (7)(8). Para a conceção de estudos a longo prazo com exposição por via inalatória, recomenda-se especificamente a consulta dos capítulos B.8 (9) e B.29 (10) deste anexo e do documento de orientações da OCDE relativo a ensaios de toxicidade aguda por inalação (8). No caso dos ensaios por via dérmica, deve consultar-se o capítulo B.9 (11) deste anexo.
5. Os estudos de carcinogenicidade fornecem informações sobre os perigos para a saúde que podem potencialmente advir da exposição repetida durante um período que pode abranger todo o tempo de vida da espécie utilizada. Estes estudos fornecem informações sobre os efeitos tóxicos do produto químico em causa, incluindo o potencial de carcinogénese, podendo indicar os órgãos afetados e a possibilidade de acumulação. Podem igualmente servir para obter estimativas do nível sem observação de efeitos adversos ("*no observed adverse effect level*", NOAEL) para efeitos tóxicos e, no caso dos produtos cancerígenos não genotóxicos, para respostas tumorais, com base nas quais se podem estabelecer critérios de segurança para a exposição humana. Salienta-se a necessidade de um exame clínico cuidadoso dos animais, de modo a obter-se o máximo de informação possível.
6. Entre os objetivos dos estudos de carcinogenicidade efetuados por este método contam-se os seguintes:
  - identificação das propriedades cancerígenas do produto químico em estudo suscetíveis de aumentar a incidência de neoplasias ou a proporção de neoplasias malignas, ou de reduzir o tempo que as neoplasias demoram a surgir, comparativamente aos grupos de controlo em paralelo,
  - identificação do órgão ou órgãos afetados pela carcinogénese,
  - identificação do tempo que as neoplasias demoram a surgir,

- caracterização de relações entre a dose administrada e a resposta tumoral,
- determinação de níveis sem observação de efeitos adversos (NOAEL) ou ponto de partida para o estabelecimento de doses de referência,
- extrapolação de efeitos cancerígenos para doses baixas de exposição humana,
- obtenção de dados para verificação de hipóteses relativas a modos de ação (2)(7)(12)(13)(14)(15).

#### CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. Antes de efetuar um estudo com vista à caracterização e avaliação da carcinogenicidade potencial de um produto químico, o laboratório que efetuará os ensaios deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa, a fim de adaptar o estudo de modo a melhorar a eficiência da determinação do potencial cancerígeno e para minimizar o recurso a animais. É especialmente importante conhecer e ter em conta o modo de ação do agente cancerígeno suspeito (2)(7)(12)(13)(14)(15), dado que a conceção ótima do estudo pode ser diferente consoante o produto químico em causa seja ou não um agente cancerígeno/genotóxico reconhecido ou se suspeite ou não de que o possa ser. Para mais orientações sobre o modo de ação, consultar o documento de orientações n.º 116 (9).
8. Entre os elementos que podem ser úteis na conceção do estudo contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em causa, resultados de ensaios de toxicidade (incluindo de genotoxicidade) *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana, dados (Q)SAR — "*quantitative structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e dados de mutagenicidade/genotoxicidade, carcinogenicidade e outros dados toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins, dados toxicocinéticos disponíveis (dados cinéticos associados a uma dose única ou a doses múltiplas) e dados provenientes de outros estudos com exposição repetida. Só deve proceder-se à determinação da carcinogenicidade depois de obtidos dados de toxicidade preliminares provenientes de estudos de toxicidade com repetição da dose administrada durante 28 e/ou 90 dias. Os ensaios a curto prazo da promoção do desencadeamento de cancro também podem fornecer informações úteis. Deve ponderar-se uma abordagem faseada dos ensaios de carcinogenicidade no âmbito da avaliação global dos potenciais efeitos adversos na saúde do produto químico em estudo (16)(17)(18)(19).
9. Antes de iniciar o estudo, devem ser escolhidos, com base no plano experimental e nos objetivos estabelecidos, os métodos estatísticos mais adequados para a análise dos resultados. Entre outros aspetos a considerar, é necessário determinar se o tratamento estatístico deverá contemplar ajustamentos em função do grau de sobrevivência, a análise do risco tumoral acumulado em função do tempo de sobrevivência e a análise do tempo que os tumores demoram a surgir, bem como que tipo de análise deve efetuar-se no caso da morte prematura de todos os animais de um ou mais grupos. Para orientações sobre as análises estatísticas mais adequadas e informação sobre as referências bibliográficas fundamentais dos métodos estatísticos internacionalmente reconhecidos, deve consultar-se o documento de orientações n.º 116 (7), assim como o documento de orientações n.º 35, relativo à análise e avaliação de estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (20).
10. Ao realizar um estudo de carcinogenicidade, recomenda-se que sejam sempre seguidos os princípios e considerações orientadores enunciados no *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (n.º 19) da OCDE (21), nomeadamente os expressos no ponto 62 do mesmo, cuja tradução é a seguinte: "*Nos estudos com repetição da dose administrada, se um animal evidenciar sinais clínicos progressivos da deterioração do seu estado, deve tomar-se uma decisão com conhecimento de causa sobre se deve ou não ser eutanasiado. Para isso, deve ponderar-se, nomeadamente, o valor das informações que seriam obtidas no caso de o animal continuar integrado no estudo, relativamente ao estado geral do mesmo. Caso se decida manter o animal no estudo, deve aumentar-se, tanto quanto necessário, a frequência dos exames que lhe são efetuados. Também é possível, sem prejudicar a finalidade do ensaio, suspender temporariamente a administração do produto químico em estudo – se isso reduzir a dor ou sofrimento do animal – ou reduzir a dose administrada*".
11. Para orientações pormenorizadas sobre os princípios aplicáveis à escolha das doses para estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade e uma discussão dos mesmos, recomenda-se a consulta do documento de orientações n.º 116 (7) e das publicações com as referências 22 e 23 do *International Life Sciences Institute*. A estratégia de base para escolha das doses depende do objetivo ou objetivos principais do estudo (ver o ponto 6). Para escolher doses adequadas, importa estabelecer um equilíbrio entre, por um lado, a identificação dos perigos em jogo e, por outro, a caracterização e importância das respostas às doses reduzidas. Este equilíbrio é especialmente necessário quando se realizam estudos combinados de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo) — ver o ponto 12.
12. Deve ponderar-se a oportunidade de efetuar um estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo), em vez de efetuar separadamente um estudo de toxicidade crónica (capítulo B.30 deste anexo) e um estudo de carcinogenicidade (o presente método B.32). O estudo combinado é mais favorável, em termos de tempo e de custos, do que dois estudos distintos e não prejudica a qualidade dos dados obtidos na etapa de toxicidade crónica nem na etapa de carcinogenicidade. Ao efetuar um estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo), é, porém, necessário prestar especial atenção aos princípios relativos à escolha das doses (pontos 11 e 22 a 25). Reconhece-se, porém, que determinadas regulamentações podem exigir a realização de estudos separados.



13. No final do capítulo e no documento de orientações n.º 116 (7) definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

#### PRINCÍPIO DO MÉTODO

14. Administra-se diariamente, normalmente por via oral, o produto químico em estudo a vários grupos de animais, em doses crescentes de grupo para grupo, durante grande parte do tempo de vida dos animais. A via inalatória ou a via dérmica também podem ser adequadas. Verifica-se atentamente se os animais evidenciam sinais de toxicidade ou se neles estão a desenvolver-se lesões neoplásicas. Autopsia-se os animais que morrem ou são eutanasiados durante os ensaios. No final dos ensaios, eutanasia-se e autopsia-se os animais sobreviventes.

#### DESCRIÇÃO DO MÉTODO

##### **Escolha da espécie animal**

15. Este método trata, em especial, da caracterização e avaliação da carcinogenicidade em roedores (ver o ponto 2). Pode ponderar-se o recurso a outras espécies se os dados disponíveis indicarem que as espécies em causa permitem prever melhor os efeitos na saúde humana. É necessário justificar a escolha da espécie. Embora possa recorrer-se a outras espécies de roedores, como o ratinho, a espécie preferida é o rato. Se bem que os estudos de carcinogenicidade no ratinho possam ser de pouca utilidade (24)(25)(26), alguns programas obrigatórios continuam a exigir ensaios de carcinogenicidade nessa espécie, a menos que se demonstre que, do ponto de vista científico, este estudo não é necessário. O rato e o ratinho constituem os modelos experimentais preferidos devido à sua longevidade relativamente reduzida, à sua utilização generalizada em estudos farmacológicos e toxicológicos, à sua sensibilidade à indução de tumores e à disponibilidade de estirpes suficientemente caracterizadas destas espécies. Em consequência disto, dispõe-se de numerosos dados sobre a fisiologia e patologia destes animais. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a escolha da espécie e da estirpe.
16. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. De preferência, o estudo de carcinogenicidade deve ser realizado com animais da mesma estirpe e proveniência que os utilizados no estudo ou estudos preliminares mais curtos. Todavia, se os animais da estirpe e proveniência em questão não corresponderem reconhecidamente aos critérios normalmente aceites de sobrevivência em estudos de longo prazo — ver o documento de orientações n.º 116 (7) —, deve ponderar-se a utilização de uma estirpe animal cuja taxa de sobrevivência no estudo a longo prazo seja aceitável. As fêmeas utilizadas devem ser nulas e não podem estar grávidas.

##### **Condições de alojamento e de alimentação**

17. Os animais podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo. É necessário justificar cientificamente a opção pelo alojamento individual (27)(28)(29). As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 30 %, no mínimo, e um valor máximo que, preferencialmente, não deve exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições. A dieta deve satisfazer as necessidades nutricionais da espécie estudada. Os teores de contaminantes da dieta — resíduos de pesticidas, poluentes orgânicos persistentes, fitoestrogénios, metais pesados, micotoxinas e outros — podem influenciar os resultados dos ensaios e devem ser os mais baixos possíveis. É necessário obter periodicamente dados analíticos relativos aos teores de nutrientes e de contaminantes da dieta, pelo menos no início do estudo e quando se muda de lote. Estes dados devem constar do relatório final. É igualmente necessário dispor de dados analíticos da água de beber utilizada no estudo. Quando o produto químico em estudo é administrado por via alimentar, a escolha da dieta pode ser influenciada pela necessidade de nela misturar convenientemente esse produto químico e de satisfazer simultaneamente as exigências nutricionais dos animais.

##### **Preparação dos animais**

18. Os animais utilizados devem ser saudáveis e ter sido aclimatados às condições laboratoriais durante, pelo menos, sete dias e não devem ter participado em experiências anteriores. No caso dos roedores, a administração do produto químico em estudo deve iniciar-se logo que possível após o desmame e a aclimação, de preferência antes de os animais completarem oito semanas. É necessário caracterizar a espécie, a estirpe, a proveniência, o sexo, o peso e a idade dos animais utilizados no estudo. No início do estudo, as diferenças de peso entre os animais de cada sexo devem ser mínimas, não se desviando mais de 20 % do peso médio de todos os animais de cada sexo nele utilizados. Distribuem-se aleatoriamente os animais pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. Depois da distribuição aleatória dos animais, a média de peso corporal não deve diferir significativamente de grupo para grupo de animais do mesmo sexo. Se houver diferenças com significado estatístico, os animais devem, se possível, ser redistribuídos aleatoriamente. Deve atribuir-se a cada animal um número de identificação único, com o qual o animal seja identificado por tatuagem, implantação de *microchip* ou outro método adequado.

**PROCEDIMENTO****Número e sexo dos animais**

19. Devem ser utilizados animais de ambos os sexos. O número de animais utilizados deve ser suficiente para uma avaliação biológica e estatística aprofundada. Cada grupo de dose e cada grupo de controlo em paralelo não deve, portanto, ter menos de 50 animais de cada sexo. Consoante a finalidade do estudo, poderá aumentar-se a representatividade estatística das principais estimativas distribuindo desigualmente os animais pelos vários grupos de dosagem, constituindo grupos com mais de 50 animais para as doses mais baixas, por exemplo, para estimar o potencial cancerígeno a doses baixas. Todavia, importa ter presente que um aumento ligeiro do tamanho dos grupos aumenta relativamente pouco a representatividade estatística do estudo. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a conceção estatística do estudo e a escolha das doses para maximizar a representatividade estatística.

**Eutanásias intercalares e grupos satélites (sentinelas)**

20. Caso se justifique do ponto de vista científico, pode prever-se a realização de eutanásias intercalares, por exemplo, ao fim de doze meses, para obter informações sobre a evolução das alterações neoplásicas, bem como dados mecanísticos. Caso já se disponha desses dados, obtidos em estudos de toxicidade por dose repetida realizados com o produto químico em causa, as eutanásias em questão podem não se justificar cientificamente. Caso esteja prevista no estudo a realização de eutanásias intercalares, o número de animais a utilizar com essa finalidade em cada grupo de dose é normalmente de dez de cada sexo. Nesse caso, o número total de animais utilizado no estudo deve ser aumentado no número de animais a eutanasiar antes da conclusão do mesmo. Pode prever-se um grupo de animais sentinelas (habitualmente cinco animais de cada sexo) para verificar, se necessário, o aparecimento de doenças durante o estudo (30). Para mais informações, consultar o documento de orientações n.º 116 (7).

**Grupos de dose e dosagens**

21. O documento de orientações n.º 116 (7) contém orientações relativas a todos os aspetos relacionados com a escolha das doses e os intervalos entre estas. Devem ser utilizados pelo menos três doses e um controlo em paralelo. As doses baseiam-se, normalmente, nos resultados de estudos exploratórios das doses ou de estudos de dose repetida por períodos mais curtos e devem atender aos dados toxicológicos e toxicocinéticos disponíveis sobre o produto químico em estudo ou produtos químicos afins.
22. A menos que tal dose esteja limitada pelas características físico-químicas ou pelos efeitos biológicos do produto químico em estudo, deve escolher-se para dose mais elevada o nível que permita identificar os principais órgãos afetados e os efeitos tóxicos principais sem causar sofrimento, efeitos tóxicos intensos, morbidez nem mortalidade. Tendo presente o referido no ponto 23, normalmente escolhe-se para dose mais elevada uma dose que induza efeitos tóxicos, evidenciados, por exemplo, por uma redução (aproximadamente de 10 %) do ganho de peso corporal. Todavia, consoante os objetivos do estudo (ver o ponto 6), pode escolher-se uma dose máxima inferior à que evidencia efeitos tóxicos, por exemplo, se essa dose induzir um efeito adverso preocupante, mas com pouca influência na longevidade ou no peso corporal dos animais.
23. Podem ser escolhidos doses e intervalos entre doses que permitam estabelecer uma relação dose-resposta e, consoante o modo de ação do produto químico em estudo, determinar um NOAEL ou outro resultado pretendido do estudo, por exemplo, uma dose de referência (ver o ponto 25) ao nível de dose mais baixo. Entre os fatores a ter em conta na escolha das doses mais baixas, contam-se o declive esperado da curva dose-resposta, as doses às quais podem ocorrer alterações importantes ao nível metabólico ou do modo da ação tóxica, o nível ao qual se prevê a ocorrência de um limiar e o nível ao qual se prevê fixar o ponto de partida de extrapolações para doses mais baixas.
24. O intervalo entre as doses depende das características do produto químico em estudo e não pode ser prescrito neste método. Contudo, a utilização de intervalos definidos por um fator de 2 a 4 entre doses consecutivas dá frequentemente bons resultados nestes ensaios, sendo muitas vezes melhor ensaiar um quarto grupo do que recorrer a intervalos muito grandes (por exemplo, mais do que um fator de 6 a 10) entre as dosagens. Em geral, são de evitar fatores superiores a 10. Caso contrário, é necessário justificá-los.
25. Conforme se explica mais em pormenor no documento de orientações n.º 116 (7), entre os aspetos a ter em conta na escolha das doses contam-se os seguintes:
  - relações não lineares ou pontos de inflexão conhecidos ou de que se suspeite na curva dose-resposta,
  - aspetos toxicocinéticos e doses às quais ocorra, ou não ocorra, indução metabólica, saturação ou não linearidade entre as doses externas e as doses internas,
  - lesões precursoras, marcadores de efeitos ou indicadores de processos biológicos fundamentais subjacentes em curso,
  - aspetos fundamentais (ou de que se suspeite) do modo de ação, tais como as doses às quais começam a manifestar-se efeitos citotóxicos, os níveis hormonais são perturbados, os mecanismos homeostáticos colapsam, etc.,

- regiões da curva dose-resposta que necessitam de estimativas especialmente rigorosas, por exemplo, perto da dose de referência prevista ou da dose à qual se suspeite corresponder um limiar,
  - níveis previstos de exposição humana.
26. O grupo de controlo deve ser um grupo não exposto ao produto químico em estudo ou, se for usado um veículo para administrar o produto químico, um grupo de controlo do veículo. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos ensaiados. Caso se utilize um veículo, o grupo de controlo deve receber o volume máximo de veículo utilizado nos grupos expostos ao produto químico em estudo. Se o produto químico for administrado por via da dieta e reduzir significativamente a quantidade desta ingerida por lhe conferir menor palatabilidade, um grupo de controlo adicional alimentado do mesmo modo, em paralelo, pode constituir um grupo de controlo mais adaptado.

#### **Preparação das doses e administração do produto químico em estudo**

27. O produto químico em estudo é normalmente administrado por via oral, através da dieta ou da água de beber ou por intermédio de uma sonda esofágica. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre vias e métodos de administração. A via e o método de administração dependem do objetivo do estudo, bem como das propriedades físico-químicas e biodisponibilidade do produto químico em causa e da via e do método de exposição humana predominantes. É necessário fundamentar a via e o método de administração escolhidos. Por razões de bem-estar animal, normalmente só deve optar-se pela utilização de uma sonda esofágica no caso dos agentes relativamente aos quais a via oral e este método de administração representem razoavelmente a exposição humana potencial (por exemplo, através da ingestão de produtos farmacêuticos). No caso dos produtos químicos ingeridos com os alimentos ou disseminados no ambiente, nomeadamente pesticidas, a administração habitual é por incorporação na dieta ou na água de beber. Todavia, para outros cenários — caso da exposição profissional —, pode justificar-se a administração por outras vias.
28. Se necessário, pode suspender-se ou dissolver-se o produto químico em estudo num veículo apropriado. Devem ser tidos em conta as seguintes características que se justifiquem do veículo e de outros aditivos: efeitos na absorção, na distribuição, no metabolismo ou na retenção do produto químico em causa, efeitos nas propriedades químicas do produto químico em estudo suscetíveis de alterarem as características tóxicas do mesmo e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais. Recomenda-se que, sempre que possível, a primeira opção seja uma solução ou suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode optar-se por uma solução ou emulsão num óleo (por exemplo, em óleo de milho); em último caso, poderá recorrer-se a uma solução noutra veículo. Se o veículo utilizado não for água, é necessário conhecer as suas características de toxicidade. Deve dispor-se de informações sobre a estabilidade do produto químico em estudo e a homogeneidade das soluções ou rações de dosagem (consoante o caso) nas condições de administração (por exemplo, por via da dieta).
29. É importante assegurar que a quantidade de um produto químico em estudo administrada através da dieta ou da água de beber não interfere nas exigências normais de nutrição nem no equilíbrio hídrico. No caso dos estudos de toxicidade a longo prazo nos quais o produto químico seja administrado pela via alimentar, a concentração deste nos alimentos não deve, normalmente, exceder 5 % da ração total, a fim de evitar desequilíbrios nutricionais. Se o produto químico em estudo for administrado por via da dieta, pode optar-se por concentrações constantes nesta (mg/kg de alimentos ou ppm) ou por doses constantes em relação ao peso corporal do animal (mg/kg de peso corporal), calculadas semanalmente. Deve indicar-se a opção tomada.
30. Em caso de administração por via oral, os animais recebem uma dose quotidiana (sete dias por semana) do produto químico em estudo, no caso dos roedores normalmente durante 24 meses (ver também o ponto 32). É necessário justificar qualquer outro regime de dosagem (por exemplo, cinco dias por semana). Em caso de administração por via dérmica, os animais são normalmente expostos ao produto químico em estudo durante, pelo menos, seis horas por dia, sete dias por semana, conforme se descreve no capítulo B.9 (11) deste anexo, ao longo de 24 meses. A exposição por via inalatória é efetuada durante seis horas por dia, sete dias por semana. Todavia, caso se justifique, também podem expor-se os animais durante cinco dias por semana. O período de exposição neste caso é normalmente de 24 meses. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Se a duração da exposição for inferior a seis horas por dia, é necessário fundamentá-lo. Ver também o capítulo B.8 (9) deste anexo.
31. A administração do produto químico aos animais por meio de uma sonda esofágica deve efetuar-se à mesma hora do dia por meio de um tubo estomacal ou de uma cânula de intubação adequada. Normalmente, administra-se a dose diária de uma só vez. Porém, se o produto químico for, por exemplo, um irritante local, pode repartir-se a mesma dose diária por dois momentos. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal e deve ser o mínimo possível. No caso dos roedores, normalmente não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal (31). Para minimizar diferenças entre volumes administrados, devem ser efetuados ajustes nas concentrações, de forma que o volume seja o mesmo para todas as doses. Excetuam-se os produtos químicos potencialmente corrosivos ou irritantes, que têm de ser diluídos para evitar efeitos locais intensos. Devem evitar-se concentrações que possam provocar efeitos corrosivos ou irritantes no tubo digestivo.

### Duração do estudo

32. No caso dos roedores, normalmente a duração do estudo é de 24 meses, o que representa grande parte do tempo de vida dos animais utilizados. Consoante o tempo de vida dos animais da estirpe de espécie utilizada no estudo, este pode ser mais curto ou mais longo, mas é necessário justificá-lo. No caso de determinadas estirpes de ratinhos (por exemplo, AKR/J, C3H/J ou C57BL/6J), pode ser adequada uma duração do estudo de 18 meses. Seguem-se algumas orientações sobre a duração do estudo, o termo deste e a sobrevivência. Para mais orientações, nomeadamente no que respeita aos critérios para considerar a carcinogenicidade negativa com base na sobrevivência dos animais estudados, consultar o documento de orientações n.º 116 da OCDE, relativo à conceção e realização de estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (7).
- deve ponderar-se pôr termo ao estudo quando o número de sobreviventes do grupo exposto à dose mais baixa ou do grupo de controlo descer abaixo de 25 %,
  - se apenas morrerem prematuramente devido a efeitos tóxicos animais do grupo exposto à dose mais elevada, não deve pôr-se termo ao estudo,
  - a sobrevivência dos animais deve ser examinada separadamente para cada sexo,
  - o estudo não deve prolongar-se além do estágio em que os dados dele extraíveis deixam de ser suficientes para validar uma avaliação estatística.

### EXAMES

33. Normalmente no início e no final de cada dia, incluindo fins de semana e feriados, devem verificar-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais. Verifica-se igualmente, uma vez por dia, se os animais têm sinais com importância toxicológica, tendo em conta, no caso da administração por sonda esofágica, o período previsto de efeitos mais acentuados após a administração do produto químico. Deve prestar-se especial atenção ao desenvolvimento de tumores, registando-se o tempo decorrido até ao aparecimento destes e o local, as dimensões, o aspeto e a progressão de cada tumor visível na observação macroscópica ou identificável por palpação.

#### *Peso corporal, consumo de alimentos e de água, eficiência alimentar*

34. Todos os animais devem ser pesados no início da exposição, pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Deve medir-se o consumo de alimentos e a eficiência alimentar pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, deve medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Pode ser útil medir o consumo de água também no caso dos estudos em que se verifiquem alterações do comportamento dos animais a esse nível.

#### *Análises hematológicas e de bioquímica clínica e outras determinações*

35. A fim de extrair um máximo de informações do estudo, sobretudo no que respeita ao modo de ação, fica ao critério do diretor do estudo proceder à colheita de amostras de sangue para análises hematológicas e de bioquímica clínica. Pode também ser útil efetuar análises de urina. Para mais orientações sobre o interesse da colheita dessas amostras num estudo de carcinogenicidade, consultar o documento de orientações n.º 116 (7). Se forem consideradas úteis, pode proceder-se à colheita de amostras de sangue para análises hematológicas e de bioquímica clínica, bem como de amostras de urina para as análises respetivas, quando das eutanásias intercalares (ver o ponto 20) e a, pelo menos, dez animais de cada sexo, por grupo, no termo do estudo. As amostras de sangue devem ser colhidas, sob anestesia, num ponto determinado a indicar, por exemplo, por punção cardíaca ou no seio retro-orbital. Se for necessário conservá-las, devem sê-lo em condições adequadas. Podem igualmente preparar-se esfregaços de sangue para exame, em especial se o órgão afetado for a medula óssea. Todavia, tem sido questionada (32) a utilidade deste exame para a avaliação do potencial cancerígeno/oncogénico.

### PATOLOGIA

#### *Autópsia macroscópica*

36. Deve ser realizada a todos os animais estudados — exceto os animais sentinelas (ver o ponto 20) e outros animais satélites — uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Fica ao critério do diretor do estudo decidir em que casos é necessário autopsiar animais sentinelas ou outros animais satélites. A pesagem de órgãos normalmente não faz parte dos estudos de carcinogénese, dado que as alterações geriátricas e o desenvolvimento de tumores em fases avançadas diminuem a utilidade dessas pesagens. Todavia, estas pesagens podem ter muita importância nas avaliações baseadas na suficiência da prova, sobretudo no que respeita ao modo de ação. Se fizerem parte de estudos satélites, devem recolher-se estes dados o mais tardar um ano após o início do estudo.
37. Os tecidos a seguir indicados devem conservar-se no meio de fixação mais adequado ao tipo de tecido em causa e ao exame histopatológico previsto (33) — os tecidos entre parênteses retos são facultativos:

todas as lesões macroscópicas	coração	pâncreas	estômago (pré-estômago, estômago glandular)
glândulas suprarrenais	íleo	glândulas paratiroides	[dentes]
aorta	jejuno	nervo periférico	testículos
encéfalo (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/protuberância anelar)	rins	hipófise	timo
cego	glândulas lacrimais (exo-orbitais)	próstata	tiroide
colo do útero	fígado	reto	[língua]
glândulas de coagulação	pulmões	glândulas salivares	traqueia
cólon	gânglios linfáticos (superficiais e profundos)	vesículas seminais	bexiga urinária
duodeno	glândulas mamárias (obrigatório no caso das fêmeas e, nos machos, se for claramente dissecável)	músculo esquelético	útero, incluindo o colo do útero
epidídimo	[vias respiratórias superiores, incluindo o nariz, os cornetos e os seios paranasais]	pele	[ureteres]
olhos (incluindo a retina)	esófago	medula espinal (a três níveis: cervical, mediotorácico e lombar)	[uretra]
[fémur com articulação]	[bolbo olfativo]	baço	vagina
vesícula biliar (exceto no caso do rato)	ovários	[esterno]	secção da medula óssea e/ou uma punção recente de medula óssea
glândulas de Harder			

No caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem conservar-se ambos. Os resultados clínicos ou outros podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem conservar-se também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indicem que serão provavelmente afetados. Nos estudos por via dérmica, os órgãos a conservar são ainda os constantes da lista relativa à exposição por via oral, mas é essencial proceder igualmente à amostragem e à conservação de pele do local onde o produto químico em estudo foi aplicado. Nos estudos por inalação, a lista de tecidos do aparelho respiratório a conservar e a examinar deve seguir as recomendações dos capítulos B.8 e B.29 deste anexo. A lista de outros órgãos e tecidos a examinar neste caso (além dos tecidos do aparelho respiratório a conservar já especificados) é a estabelecida para a exposição por via oral.

#### *Histopatologia*

38. A referência 33 contém orientações sobre as melhores práticas a seguir na realização de estudos de patologias toxicológicas. Os exames devem incidir, no mínimo, nos seguintes tecidos:

- todos os tecidos dos animais dos grupos de controlo e dos grupos expostos à dose mais elevada,
- todos os tecidos dos animais que morreram ou foram eutanasiados durante o estudo,
- todos os tecidos com anomalias macroscópicas, incluindo tumores,
- os tecidos que revelaram alterações histopatológicas atribuíveis à exposição do produto químico em estudo nos animais dos grupos expostos à dose mais elevada, de todos os animais de todos os outros grupos expostos a uma dose do produto químico,
- no caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem examinar-se ambos.

## DADOS E RELATÓRIOS

**Dados**

39. Deve apresentar-se os dados por animal relativos a todos os parâmetros avaliados. Esses dados devem ainda ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais no início do ensaio, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados, a hora de cada morte ou eutanásia, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, a descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o momento do seu aparecimento e a sua duração e intensidade, o número de animais que apresentaram lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais que apresentaram cada tipo de lesão. Devem constar dos quadros de resumo dos dados as médias e os desvios-padrão (no caso dos dados contínuos) correspondentes aos animais que apresentaram lesões ou efeitos tóxicos, além do grau das lesões.
40. Os dados históricos de controlo podem ser úteis para a interpretação dos resultados do estudo, por exemplo, quando houver indicações de que os dados provenientes dos grupos de controlo em paralelo divergem significativamente de dados recentes referentes a animais de controlo da mesma colónia e da mesma unidade de ensaio. Caso sejam avaliados dados históricos de controlo, estes devem provir do mesmo laboratório, reportar-se a animais da mesma idade e estirpe e ter sido gerados nos cinco anos anteriores ao estudo em causa.
41. Quando pertinente, devem avaliar-se os resultados numéricos por um método estatístico corrente adequado. Os métodos estatísticos e os dados a analisar devem ser escolhidos no planeamento do estudo (ponto 9). Nessa escolha, devem prever-se os ajustamentos em função do grau de sobrevivência que se revelem necessários.

**Relatório dos ensaios**

42. Dados a constar do relatório dos ensaios:

*Produto químico em estudo:*

- natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas,
- dados de identificação,
- proveniência,
- número de lote,
- boletim de análises químicas.

*Veículo (se for o caso):*

- justificação da escolha do veículo (se não for água).

*Animais estudados:*

- espécie e estirpe utilizadas e justificação da opção tomada,
- número, idade e sexo dos animais no início dos ensaios,
- proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.,
- peso de cada animal no início do ensaio.

*Condições de realização dos ensaios:*

- fundamentação da via de administração e das doses escolhidas,
- métodos estatísticos utilizados na análise dos dados, se for o caso,
- elementos relativos à formulação do produto químico em estudo/à incorporação do mesmo na dieta fornecida aos animais,
- dados analíticos relativos à concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação,

- via de administração e elementos relativos à administração do produto químico em estudo,
- no caso dos estudos por inalação: exposição unicamente nasal ou de corpo inteiro,
- doses reais (mg/kg de peso corporal/dia) e, se for caso disso, fator de conversão entre a concentração do produto químico em estudo na dieta ou na água de beber (mg/kg ou ppm) e a dose real,
- pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água.

*Resultados (apresentar quadros de resumo dos dados e os dados por animal):*

*Informações gerais*

- dados de sobrevivência,
- pesos corporais e alterações de peso corporal,
- consumo de alimentos, cálculos da eficiência alimentar (se efetuados) e consumo de água (se for caso disso),
- dados toxicocinéticos, se disponíveis,
- resultados oftalmoscópicos, se disponíveis,
- resultados hematológicos, se disponíveis,
- resultados de química clínica, se disponíveis.

*Resultados dos exames clínicos*

- sinais de toxicidade,
- incidência (e, se quantificada, intensidade) das anomalias observadas,
- natureza, intensidade e duração dos sinais clínicos observados (reversíveis ou irreversíveis).

*Dados das autópsias*

- peso corporal terminal,
- peso de cada órgão (e relação com o peso corporal, se for caso disso),
- resultados das autópsias; incidência e intensidade das anomalias.

*Histopatologia*

- observação de efeitos histopatológicos não neoplásicos,
- observação de efeitos histopatológicos neoplásicos,
- correlação entre as observações macroscópicas e os resultados microscópicos,
- descrição pormenorizada dos resultados histopatológicos resultantes da exposição dos animais ao produto químico em estudo, incluindo a classificação de intensidade,

— relatórios do eventual exame das lâminas por pares especialistas.

*Tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.*

*Discussão dos resultados, nomeadamente:*

- discussão dos eventuais modelos,
- relações dose-resposta,
- dados históricos de controlo,
- análise dos dados disponíveis sobre modos de ação,
- determinação das doses de referência, do NOAEL e do LOAEL,
- importância para o ser humano.

*Conclusões*

#### REFERÊNCIAS:

- (1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995). Documento de trabalho interno. Environment Directorate, OCDE, Paris.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- (3) Combes R.D., Gaunt, I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. *ATLA* 32:163-208.
- (4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 40:145-191.
- (5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206:437-445.
- (6) Capítulo B.27 deste anexo, "Ensaio de toxicidade oral subcrónica – Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias".
- (7) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – segunda edição. Series on Testing and Assessment No. 116. Disponível no sítio Web público de *Test Guidelines* da OCDE ([www.oecd.org/env/testguidelines](http://www.oecd.org/env/testguidelines)).
- (8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.
- (9) Capítulo B.8 deste anexo, "Toxicidade subaguda por inalação: Estudo de 28 dias".
- (10) Capítulo B.29 deste anexo, "Toxicidade subcrónica por inalação: Estudo de 90 dias".
- (11) Capítulo B.9 deste anexo, "Toxicidade (dérmica) da dose repetida (28 dias)".
- (12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. *Crit. Rev. in Toxicol.*, 36:793-801.
- (13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., Fenner-Crisp P.A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:581-589.



- (14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci.* 89:51-56.
- (15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:591-653.
- (16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36:1-7.
- (17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36:9-35.
- (18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36:37-68.
- (19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36:69-98.
- (20) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies. Series on Testing and Assessment No. 35; Series on Pesticides No. 14. ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.
- (21) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.
- (22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West, W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection. *Crit. Rev. Toxicol.* 37(9):729-837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran J.A. (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N., Lumley C.E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T., Griffiths S.A., Lumley C.E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast, p. 279-284.
- (26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect.* 105:1196-1203.
- (27) Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (JO L 276 de 20.10.2010, p. 33).
- (28) National Research Council (1985). Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.
- (32) Weingand K., et al. (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 29:198-201.
- (33) Crissman J., Goodman D., Hildebrandt P., et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32:126-131.
-

## Apêndice 1

## DEFINIÇÃO

**Produto químico em estudo:** qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

## B.33. ESTUDOS COMBINADOS DE TOXICIDADE CRÓNICA E CARCINOGENICIDADE

## INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 453 (2009) da OCDE. O *Test Guideline* TG 453 inicial foi adotado em 1981. Entendeu-se necessário atualizar o método B.33 para dar conta da evolução recente no domínio do bem-estar animal e da regulamentação (1)(2)(3)(4)(5). A atualização do método B.33 decorreu paralelamente à revisão dos capítulos B.32 ("Estudos de carcinogenicidade") e B.30 ("Estudos de toxicidade crónica") deste anexo. Visa-se obter mais dados a partir dos animais utilizados nos estudos e dispor de mais elementos para a escolha das doses. Este método foi concebido para o ensaio de uma vasta gama de produtos químicos, nomeadamente pesticidas e produtos químicos industriais. Alguns aspetos e requisitos podem, porém, ser diferentes no caso dos produtos farmacêuticos (ver o documento de orientações "*Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals*", publicado pela Conferência Internacional de Harmonização).
2. Na sua maioria, os estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade são efetuados em roedores. Este método destina-se, portanto, a ser aplicado, preferencialmente, a estudos em espécies de roedores. Caso seja necessário efetuar estudos noutras espécies, os princípios e procedimentos descritos neste método e no capítulo B.27 deste anexo — "Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias" (6) — podem igualmente ser aplicados, com as adaptações necessárias e em observância das orientações do *Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (n.º 116) da OCDE (7).
3. As três vias principais de administração nos estudos de toxicidade crónica e carcinogenicidade são a via oral, a via dérmica e a via inalatória. A via de administração escolhida depende das características físico-químicas do produto químico em estudo e da via predominante de exposição humana. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a escolha da via de exposição.
4. Este método centra-se na exposição por via oral, que é a via habitualmente mais utilizada nos estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade. Embora possa também ser necessário efetuar estudos a longo prazo por via dérmica ou por inalação para avaliar o risco para a saúde humana e/ou isso possa mesmo ser exigido pela regulamentação aplicável, estas duas vias de exposição são bastante complexas do ponto de vista técnico e esses estudos têm de ser concebidos para cada caso concreto. Porém, no que diz respeito às recomendações relativas aos períodos de exposição, aos parâmetros clínicos e patológicos e a outros aspetos, o método aqui descrito para caracterização e avaliação da toxicidade crónica e da carcinogenicidade por administração oral pode constituir a base de um protocolo para estudos por inalação e/ou por via dérmica. A OCDE publicou orientações relativas ao estudo da administração de produtos químicos por inalação (7)(8) e por via dérmica (7). Para a conceção de estudos a longo prazo com exposição por via inalatória, recomenda-se especificamente a consulta dos capítulos B.8 (9) e B.29 (10) deste anexo e do documento de orientações da OCDE relativo a ensaios de toxicidade aguda por inalação (8). No caso dos ensaios por via dérmica, deve consultar-se o capítulo B.9 (11) deste anexo.
5. Os estudos combinados de toxicidade crónica e carcinogenicidade fornecem informações sobre os perigos para a saúde que podem advir potencialmente da exposição repetida durante um período que pode abranger todo o tempo de vida da espécie utilizada. Estes estudos fornecem informações sobre os efeitos tóxicos do produto químico em causa, incluindo o potencial de carcinogenicidade, bem como indicações sobre os órgãos afetados e a possibilidade de acumulação. Podem igualmente servir para obter estimativas do nível sem observação de efeitos adversos ("*no observed adverse effect level*", NOAEL) para efeitos tóxicos e, no caso dos produtos cancerígenos não genotóxicos, para respostas tumorais, com base nas quais se podem estabelecer critérios de segurança para a exposição humana. Salienta-se a necessidade de um exame clínico cuidadoso dos animais, de modo a obter-se o máximo de informação possível.
6. Entre os objetivos dos estudos de toxicidade crónica e carcinogenicidade efetuados por este método contam-se os seguintes:
  - identificação das propriedades cancerígenas do produto químico em estudo suscetíveis de aumentar a incidência de neoplasias ou a proporção de neoplasias malignas, ou de reduzir o tempo que as neoplasias demoram a surgir, comparativamente aos grupos de controlo em paralelo,
  - identificação do tempo que as neoplasias demoram a surgir,
  - identificação da toxicidade crónica de produtos químicos,

- identificação do órgão ou órgãos afetados pela toxicidade crónica e pela carcinogenicidade,
- caracterização de relações dose-resposta,
- determinação de níveis sem observação de efeitos adversos (NOAEL) ou ponto de partida para o estabelecimento de doses de referência,
- extrapolação de efeitos cancerígenos para doses baixas de exposição humana,
- previsão de efeitos de toxicidade crónica aos níveis da exposição humana,
- obtenção de dados para verificação de hipóteses relativas a modos de ação (2)(7)(12)(13)(14)(15).

#### CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. Antes de efetuar um estudo com vista à caracterização e avaliação da carcinogenicidade e da toxicidade crónica potenciais de um produto químico, o laboratório que efetuará os ensaios deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa, a fim de adaptar o estudo de modo a melhorar a eficiência da determinação das propriedades toxicológicas do mesmo e para minimizar o recurso a animais. É especialmente importante conhecer e ter em conta o modo de ação do agente cancerígeno suspeito (2)(7)(12)(13)(14)(15), dado que a conceção ótima do estudo pode ser diferente consoante o produto químico em causa seja ou não um agente cancerígeno/genotóxico reconhecido ou se suspeite ou não de que o possa ser. Para mais orientações sobre o modo de ação, consultar o documento de orientações n.º 116 (7).
8. Entre os elementos que podem ser úteis na conceção do estudo contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em causa, informações disponíveis sobre o modo de ação, resultados de ensaios de toxicidade (incluindo de genotoxicidade) *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana, dados (Q)SAR — "*quantitative structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e dados de mutagenicidade/genotoxicidade, carcinogenicidade e outros dados toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins, dados toxicocinéticos disponíveis (dados cinéticos associados a uma dose única ou a doses múltiplas) e dados provenientes de outros estudos com exposição repetida. Só deve proceder-se à determinação da toxicidade crónica e da carcinogenicidade depois de obtidos dados de toxicidade preliminares provenientes de estudos de toxicidade com repetição da dose administrada durante 28 e/ou 90 dias. Os ensaios a curto prazo da promoção do desencadeamento de cancro também podem fornecer informações úteis. Deve ponderar-se uma abordagem faseada dos ensaios de carcinogenicidade no âmbito da avaliação global dos potenciais efeitos adversos na saúde do produto químico em estudo (16)(17)(18)(19).
9. Antes de iniciar o estudo, devem escolher-se, com base no plano experimental e nos objetivos estabelecidos, os métodos estatísticos mais adequados para a análise dos resultados. Entre outros aspetos a considerar, é necessário determinar se o tratamento estatístico deverá contemplar ajustamentos em função do grau de sobrevivência, a análise do risco tumoral acumulado em função do tempo de sobrevivência e a análise do tempo que os tumores demoram a surgir, bem como que tipo de análise deve efetuar-se no caso da morte prematura de todos os animais de um ou mais grupos. Para orientações sobre as análises estatísticas mais adequadas e informação sobre as referências bibliográficas fundamentais dos métodos estatísticos internacionalmente reconhecidos, deve consultar-se o documento de orientações n.º 116 (7), assim como o documento de orientações n.º 35, relativo à análise e avaliação de estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (20).
10. Ao realizar um estudo de carcinogenicidade, recomenda-se que sejam sempre seguidos os princípios e considerações orientadores enunciados no *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* da OCDE (21), nomeadamente os expressos no ponto 62 do mesmo, cuja tradução é a seguinte: "*Nos estudos com repetição da dose administrada, se um animal evidenciar sinais clínicos progressivos da deterioração do seu estado, deve tomar-se uma decisão com conhecimento de causa sobre se deve ou não ser eutanasiado. Para isso, deve ponderar-se, nomeadamente, o valor das informações que seriam obtidas no caso de o animal continuar integrado no estudo, relativamente ao estado geral do mesmo. Caso se decida manter o animal no estudo, deve aumentar-se, tanto quanto necessário, a frequência dos exames que lhe são efetuados. Também é possível, sem prejudicar a finalidade do ensaio, suspender temporariamente a administração do produto químico em estudo – se isso reduzir a dor ou sofrimento do animal – ou reduzir a dose administrada.*"
11. Para orientações pormenorizadas sobre os princípios aplicáveis à escolha das doses para estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade e uma discussão dos mesmos, recomenda-se a consulta do documento de orientações n.º 116 (7) e das publicações com as referências 22 e 23 do International Life Sciences Institute. A estratégia de base para escolha das doses depende do objetivo ou objetivos principais do estudo (ver o ponto 6). Para escolher doses adequadas, importa estabelecer um equilíbrio entre, por um lado, a identificação dos perigos em jogo e, por outro, a caracterização e importância das respostas às doses reduzidas. Este equilíbrio é especialmente necessário quando se realizam estudos combinados de toxicidade crónica e de carcinogenicidade.

12. Deve ponderar-se a oportunidade de efetuar este estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade, em vez de efetuar separadamente um estudo de toxicidade crónica (capítulo B.30 deste anexo) e um estudo de carcinogénese (capítulo B.32 deste anexo). O estudo combinado é mais favorável, em termos de tempo e de custos e de alguma redução do recurso a animais, do que dois estudos distintos e não prejudica a qualidade dos dados obtidos na etapa de toxicidade crónica nem na etapa de carcinogenicidade. Ao efetuar um estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade, é, porém, necessário prestar especial atenção aos princípios relativos à escolha das doses (pontos 11 e 22 a 26). Reconhece-se, porém, que determinadas regulamentações podem exigir a realização de estudos separados. Para mais orientações sobre a otimização dos estudos combinados de toxicidade crónica e de carcinogenicidade, ao nível das possibilidades de redução do número de animais utilizados e através da racionalização dos procedimentos experimentais, consultar o documento de orientações n.º 116 (7).
13. No final do capítulo e no documento de orientações n.º 116 (7) define-se alguns conceitos utilizados neste método.

#### PRINCÍPIO DO MÉTODO

14. O estudo consiste em duas etapas em paralelo, uma relativa à toxicidade crónica e outra relativa à carcinogenicidade (ver as durações respetivas nos pontos 34 e 35). Normalmente, administra-se o produto químico por via oral, embora a via inalatória ou a via dérmica também possam ser adequadas. Na etapa relativa à toxicidade crónica, administra-se diariamente o produto químico em estudo a vários grupos de animais, em doses crescentes de grupo para grupo, normalmente durante doze meses, embora possam escolher-se períodos mais longos ou mais curtos em função das exigências da regulamentação (ver o ponto 34). Escolhe-se a duração do estudo de modo a ser suficientemente longa para que os eventuais efeitos de toxicidade acumulada se manifestem, mas sem que sejam perturbados por alterações ligadas ao envelhecimento dos animais. Pode estar prevista a realização de uma ou mais eutanásias intercalares, por exemplo, após três ou seis meses. Nesse caso, pode aumentar-se o número de grupos de animais em conformidade (ver o ponto 20). Na etapa relativa à carcinogenicidade, administra-se diariamente o produto químico em estudo a vários grupos de animais, durante grande parte do tempo de vida dos animais. Verifica-se atentamente, relativamente a ambas as etapas, se os animais evidenciam sinais de toxicidade ou se neles estão a desenvolver-se lesões neoplásicas. Autopsia-se os animais que morrem ou são eutanasiados durante os ensaios. No final dos ensaios, eutanasia-se e autopsia-se os animais sobreviventes.

#### DESCRIÇÃO DO MÉTODO

##### **Escolha da espécie animal**

15. Este método trata, em especial, da caracterização e avaliação da toxicidade crónica e da carcinogenicidade em roedores (ver o ponto 2). Pode ponderar-se o recurso a outras espécies se os dados disponíveis indicarem que as espécies em causa permitem prever melhor os efeitos na saúde humana. É necessário justificar a escolha da espécie. Embora possa recorrer-se a outras espécies de roedores, como o ratinho, a espécie preferida é o rato. Se bem que os estudos de carcinogenicidade no ratinho possam ser de pouca utilidade (24)(25)(26), alguns programas obrigatórios continuam a exigir ensaios de carcinogenicidade nessa espécie, a menos que se demonstre que, do ponto de vista científico, este estudo não é necessário. O rato e o ratinho constituem os modelos experimentais preferidos devido à sua longevidade relativamente reduzida, à sua utilização generalizada em estudos farmacológicos e toxicológicos, à sua sensibilidade à indução de tumores e à disponibilidade de estirpes suficientemente caracterizadas destas espécies. Em consequência disto, dispõe-se de numerosos dados sobre a fisiologia e patologia destes animais. Se forem exigidos estudos de toxicidade crónica e carcinogenicidade em espécies que não sejam de roedores, a conceção e realização desses estudos deve basear-se nos princípios descritos no presente método e no capítulo B.27 deste anexo — "Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias" (6). O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a escolha da espécie e da estirpe.
16. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. De preferência, o estudo combinado de toxicidade crónica e carcinogenicidade deve ser realizado com animais da mesma estirpe e proveniência que os utilizados no estudo ou estudos preliminares mais curtos de toxicidade. Todavia, se os animais da estirpe e proveniência em questão não corresponderem reconhecidamente aos critérios normalmente aceites de sobrevivência em estudos de longo prazo — ver o documento de orientações n.º 116 (7) —, deve ponderar-se a utilização de uma estirpe animal cuja taxa de sobrevivência no estudo a longo prazo seja aceitável. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas.

##### **Condições de alojamento e alimentação**

17. Os animais podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo. É necessário justificar cientificamente a opção pelo alojamento individual (27)(28)(29). As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 30 %, no mínimo, e um valor máximo que, preferencialmente, não deve exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições. A dieta deve satisfazer as necessidades nutricionais da espécie estudada. Os teores de contaminantes da dieta — resíduos de pesticidas, poluentes orgânicos persistentes, fitoestrogénios, metais pesados, micotoxinas e outros — podem influenciar os resultados dos ensaios e devem ser os mais baixos possíveis. É necessário obter periodicamente dados analíticos relativos aos teores de nutrientes e de contaminantes da dieta, pelo menos no início do estudo e quando se muda de

lote. Estes dados devem constar do relatório final. É igualmente necessário dispor de dados analíticos da água de beber utilizada no estudo. Quando o produto químico em estudo é administrado por via alimentar, a escolha da dieta pode ser influenciada pela necessidade de nela misturar convenientemente esse produto químico e de satisfazer simultaneamente as exigências nutricionais dos animais.

#### **Preparação dos animais**

18. Os animais utilizados devem ser saudáveis e ter sido aclimatados às condições laboratoriais durante, pelo menos, sete dias e não devem ter participado em experiências anteriores. No caso dos roedores, a administração do produto químico em estudo deve iniciar-se logo que possível após o desmame e a aclimação, de preferência antes de os animais completarem oito semanas. É necessário caracterizar a espécie, a estirpe, a proveniência, o sexo, o peso e a idade dos animais utilizados no estudo. No início do estudo, as diferenças de peso entre os animais de cada sexo devem ser mínimas, não se desviando mais de 20 % do peso médio de todos os animais de cada sexo nele utilizados. Distribuem-se aleatoriamente os animais pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. Depois da distribuição aleatória dos animais, a média de peso corporal não deve diferir significativamente de grupo para grupo de animais do mesmo sexo. Se houver diferenças com significado estatístico, os animais devem, se possível, ser redistribuídos aleatoriamente. Deve atribuir-se a cada animal um número de identificação único, com o qual o animal seja identificado por tatuagem, implantação de *microchip* ou outro método adequado.

#### **PROCEDIMENTO**

##### **Número e sexo dos animais**

19. Devem ser utilizados animais de ambos os sexos. O número de animais utilizados deve ser suficiente para uma avaliação biológica e estatística aprofundada. No caso dos roedores, cada grupo de dose (ver o ponto 22) e grupo de controlo em paralelo destinado à etapa de carcinogenicidade do estudo não deve, portanto, ter menos de 50 animais de cada sexo. Consoante a finalidade do estudo, poderá aumentar-se a representatividade estatística das principais estimativas distribuindo desigualmente os animais pelos vários grupos de dose, constituindo grupos com mais de 50 animais para as doses mais baixas, por exemplo, para estimar o potencial cancerígeno a doses baixas. Todavia, importa ter presente que um aumento ligeiro do tamanho dos grupos aumenta relativamente pouco a representatividade estatística do estudo. No caso dos roedores, cada grupo de dose (ver o ponto 22) e grupo de controlo em paralelo destinado à etapa de toxicidade crónica do estudo deve ser constituído por, pelo menos, 10 animais de cada sexo, número que é inferior ao utilizado no estudo de toxicidade crónica (capítulo B.30 deste anexo). Todavia, na interpretação dos dados provenientes de grupos com menos animais na etapa de toxicidade crónica deste estudo combinado, são tidos em conta os dados provenientes da etapa de carcinogenicidade, na qual os efetivos são maiores. Nos estudos com ratinhos, pode ser necessário reforçar o número de animais em cada grupo exposto na etapa de toxicidade crónica, para poder realizar todas as determinações hematológicas previstas. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a conceção estatística do estudo e a escolha das doses para maximizar a representatividade estatística.

##### **Eutanásias intercalares, grupo satélite e animais sentinelas**

20. Caso se justifique do ponto de vista científico, pode prever-se a realização de eutanásias intercalares – por exemplo, ao fim de seis meses, na etapa de toxicidade crónica — para obter informações sobre a evolução das alterações neoplásicas, bem como dados mecanísticos. Caso já se disponha desses dados, obtidos em estudos de toxicidade por dose repetida realizados com o produto químico em causa, as eutanásias em questão podem não se justificar cientificamente. Os animais utilizados na etapa de toxicidade crónica do estudo — que, normalmente, se prolonga por doze meses (ponto 34) — fornecem dados equiparados aos de uma eutanásia intercalar para a etapa de carcinogenicidade do mesmo, reduzindo-se assim o número total de animais utilizados. Podem também prever-se grupos satélites na etapa de toxicidade crónica do estudo, para verificar a reversibilidade de alterações toxicológicas induzidas pelo produto químico em estudo. Nesse caso, os grupos satélite podem restringir-se à dose mais elevada em estudo e aos grupos de controlo. Pode prever-se um grupo de animais sentinelas (habitualmente cinco animais de cada sexo) para verificar, se necessário, o aparecimento de doenças durante o estudo (30). O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a maneira de, minimizando o número total de animais utilizados, incluir no estudo eutanásias intercalares e animais satélites e sentinelas.
21. Caso esteja prevista no estudo a existência de animais satélites e/ou a realização de eutanásias intercalares, o número de animais a utilizar com essas finalidades em cada grupo de dose é normalmente de dez de cada sexo. Nesse caso, o número total de animais utilizado no estudo deve ser aumentado no número de animais a eutanasiar antes da conclusão do mesmo. Normalmente, os animais satélites e os animais sujeitos à eutanásia intercalar devem ser objeto do mesmo exame, nomeadamente peso corporal, consumo de alimentos e de água, análises hematológicas e de bioquímica clínica e exames patológicos, que os animais participantes na etapa de toxicidade crónica do estudo principal, embora também possa prever-se (no caso dos grupos com destino a eutanásia intercalar) que as determinações se limitem a parâmetros fundamentais específicos, por exemplo, de neurotoxicidade ou de imunotoxicidade.

##### **Grupos de dose e dosagens**

22. O documento de orientações n.º 116 (7) contém orientações relativas a todos os aspetos relacionados com a escolha das doses e os intervalos entre estas. Devem ser utilizados pelo menos três doses e um controlo em paralelo, para as etapas de toxicidade crónica e de carcinogenicidade. As doses baseiam-se, normalmente, nos resultados de estudos exploratórios das doses ou de estudos de dose repetida por períodos mais curtos e devem atender aos dados toxicológicos e toxicocinéticos disponíveis sobre o produto químico em estudo ou produtos químicos afins.

23. Se for de prever que o ensaio, na etapa de toxicidade crónica do estudo, de uma dose não inferior a 1 000 mg/kg de peso corporal/dia não provoque efeitos adversos, pode considerar-se que não é necessário efetuar um estudo completo com três doses. Esta decisão deve basear-se nos resultados de estudos preliminares e, tendo em conta dados referentes a produtos químicos estruturalmente afins, na provável ausência de efeitos tóxicos. Nesses casos, pode justificar-se um limite de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia, exceto se os dados relativos à exposição humana aconselharem o ensaio de uma dose superior.
24. A menos que tal dose esteja limitada pelas características físico-químicas ou pelos efeitos biológicos do produto químico em estudo, deve escolher-se para dose mais elevada o nível que permita identificar os principais órgãos afetados e os efeitos tóxicos principais sem causar sofrimento, efeitos tóxicos intensos, morbidez nem mortalidade. Normalmente, escolhe-se para dose mais elevada uma dose que induza efeitos tóxicos, evidenciados, por exemplo, por uma redução (aproximadamente de 10 %) do ganho de peso corporal. Todavia, consoante os objetivos do estudo (ver o ponto 6), pode escolher-se uma dose máxima inferior à que evidencia efeitos tóxicos, por exemplo, se essa dose induzir um efeito adverso preocupante, mas com pouca influência na longevidade ou no peso corporal dos animais.
25. Podem escolher-se doses e intervalos entre doses que permitam estabelecer uma relação dose-resposta e, consoante o modo de ação do produto químico em estudo, determinar um NOAEL ou outro resultado pretendido do estudo, por exemplo, uma dose de referência (ver o ponto 27). Entre os fatores a ter em conta na escolha das doses mais baixas, contam-se o declive esperado da curva dose-resposta, as doses às quais podem ocorrer alterações importantes ao nível metabólico ou do modo da ação tóxica, o nível ao qual se prevê a ocorrência de um limiar e o nível ao qual se prevê fixar o ponto de partida de extrapolações para doses mais baixas. O objetivo principal de um estudo combinado de carcinogenicidade e de toxicidade crónica é obter informações destinadas à avaliação do risco de carcinogenicidade, sendo a recolha de dados relativos à toxicidade crónica um objetivo normalmente secundário. É importante ter isto presente ao escolher as doses e os intervalos entre doses para o estudo a realizar.
26. O intervalo entre as doses depende dos objetivos do estudo e das características do produto químico em estudo e não pode ser particularizado neste método. Contudo, a utilização de intervalos definidos por um fator de 2 a de 4 entre doses consecutivas dá frequentemente bons resultados nestes ensaios, sendo muitas vezes melhor ensaiar um quarto grupo do que recorrer a intervalos muito grandes (por exemplo, mais do que um fator de 6 a 10) entre as dosagens. Em geral, são de evitar fatores superiores a 10. Caso contrário, é necessário justificá-los.
27. Conforme se explica mais em pormenor no documento de orientações n.º 116 (7), entre os aspetos a ter em conta na escolha das doses contam-se os seguintes:
- relações não lineares ou pontos de inflexão conhecidos ou de que se suspeite na curva dose-resposta,
  - aspetos toxicocinéticos e doses às quais ocorra, ou não ocorra, indução metabólica, saturação ou não linearidade entre as doses externas e as doses internas,
  - lesões precursoras, marcadores de efeitos ou indicadores de processos biológicos fundamentais subjacentes em curso,
  - aspetos fundamentais (ou de que se suspeite) do modo de ação, tais como as doses às quais começam a manifestar-se efeitos citotóxicos, os níveis hormonais são perturbados, os mecanismos homeostáticos colapsam, etc.,
  - regiões da curva dose-resposta que necessitam de estimativas especialmente rigorosas, por exemplo, perto da dose de referência prevista ou da dose à qual se suspeite corresponder um limiar,
  - níveis previstos de exposição humana, sobretudo na escolha das doses baixas e intermédias.
28. O grupo de controlo deve ser um grupo não exposto ao produto químico em estudo ou, se for usado um veículo para administrar o produto químico, um grupo de controlo do veículo. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos ensaiados. Caso se utilize um veículo, o grupo de controlo deve receber o volume máximo de veículo utilizado nos grupos expostos ao produto químico em estudo. Se o produto químico for administrado por via da dieta e reduzir significativamente a quantidade desta ingerida por lhe conferir menor palatabilidade, um grupo de controlo adicional alimentado do mesmo modo, em paralelo, pode constituir um grupo de controlo mais adaptado.

#### **Preparação das doses e administração do produto químico em estudo**

29. O produto químico em estudo é normalmente administrado por via oral, através da dieta ou da água de beber ou por intermédio de uma sonda esofágica. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre vias e métodos de administração. A via e o método de administração dependem do objetivo do estudo, bem como das propriedades físico-químicas e biodisponibilidade do produto químico em causa e da via e do método de exposição humana predominantes. É necessário fundamentar a via e o método de administração escolhidos. Por razões de bem-estar animal, normalmente só deve optar-se pela utilização de uma sonda esofágica no caso dos agentes relativamente aos quais a via oral e este método de administração representem

razoavelmente a exposição humana potencial (por exemplo, através da ingestão de produtos farmacêuticos). No caso dos produtos químicos ingeridos com os alimentos ou disseminados no ambiente, nomeadamente pesticidas, a administração habitual é por incorporação na dieta ou na água de beber. Todavia, para outros cenários – caso da exposição profissional –, pode justificar-se a administração por outras vias.

30. Se necessário, pode suspender-se ou dissolver-se o produto químico em estudo num veículo apropriado. Devem ser tidos em conta as seguintes características que se justifiquem do veículo e de outros aditivos: efeitos na absorção, na distribuição, no metabolismo ou na retenção do produto químico em causa, efeitos nas propriedades químicas do produto químico em estudo suscetíveis de alterarem as características tóxicas do mesmo e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais. Recomenda-se que, sempre que possível, a primeira opção seja uma solução ou suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode optar-se por uma solução ou emulsão num óleo (por exemplo, em óleo de milho); em último caso, poderá recorrer-se a uma solução noutra veículo. Se o veículo utilizado não for água, é necessário conhecer as suas características de toxicidade. Deve dispor-se de informações sobre a estabilidade do produto químico em estudo e a homogeneidade das soluções ou rações de dosagem (consoante o caso) nas condições de administração (por exemplo, por via da dieta).
31. É importante assegurar que a quantidade de um produto químico em estudo administrada através da dieta ou da água de beber não interfere nas exigências normais de nutrição nem no equilíbrio hídrico. No caso dos estudos de toxicidade a longo prazo nos quais o produto químico seja administrado pela via alimentar, a concentração deste nos alimentos não deve, normalmente, exceder 5 % da ração total, a fim de evitar desequilíbrios nutricionais. Se o produto químico em estudo for administrado por via da dieta, pode optar-se por concentrações constantes nesta (mg/kg de alimentos ou ppm) ou por doses constantes em relação ao peso corporal do animal (mg/kg de peso corporal), calculadas semanalmente. Deve indicar-se a opção tomada.
32. Em caso de administração por via oral, os animais recebem uma dose quotidiana (sete dias por semana) do produto químico em estudo, ao longo de 12 meses (na etapa de toxicidade crónica) ou de 24 meses (na etapa de carcinogenicidade) — ver também os pontos 33 e 34. É necessário justificar qualquer outro regime de dosagem (por exemplo, cinco dias por semana). Em caso de administração por via dérmica, os animais são normalmente expostos ao produto químico em estudo durante, pelo menos, seis horas por dia, sete dias por semana, conforme se descreve no capítulo B.9 (11) deste anexo, ao longo de 12 meses (na etapa de toxicidade crónica) ou de 24 meses (na etapa de carcinogenicidade). A exposição por via inalatória é efetuada durante seis horas por dia, sete dias por semana. Todavia, caso se justifique, também podem expor-se os animais durante cinco dias por semana. O período de exposição neste caso é normalmente de 12 meses (na etapa de toxicidade crónica) ou de 24 meses (na etapa de carcinogenicidade). Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Se a duração da exposição for inferior a seis horas por dia, é necessário fundamentá-lo. Ver também o capítulo B.8 (9) deste anexo.
33. A administração do produto químico aos animais por meio de uma sonda esofágica deve efetuar-se à mesma hora do dia por meio de um tubo estomacal ou de uma cânula de intubação adequada. Normalmente, administra-se a dose diária de uma só vez. Porém, se o produto químico for, por exemplo, um irritante local, pode repartir-se a mesma dose diária por dois momentos. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal e deve ser o mínimo possível. No caso dos roedores, normalmente não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal (31). Para minimizar diferenças entre volumes administrados, devem ser efetuados ajustes nas concentrações, de forma que o volume seja o mesmo para todas as doses. Excetuam-se os produtos químicos potencialmente corrosivos ou irritantes, que têm de ser diluídos para evitar efeitos locais intensos. Devem evitar-se concentrações que possam provocar efeitos corrosivos ou irritantes no tubo digestivo.

#### **Duração do estudo**

34. Embora o período de exposição e a etapa de toxicidade crónica deste estudo se prolonguem, normalmente, por 12 meses, este método também está adaptado e pode aplicar-se a estudos mais curtos (por exemplo, seis ou nove meses) ou mais longos (por exemplo, 18 ou 24 meses), consoante o exija a regulamentação pertinente ou por razões mecánicas determinadas. Se o período de exposição não for de 12 meses, é necessário fundamentá-lo, sobretudo se a duração da exposição for mais curta. A exposição de todos os grupos que participam nesta etapa termina no momento previsto para as avaliações de toxicidade crónica e de patologias não neoplásicas. Os grupos satélites incluídos para verificar a reversibilidade de alterações toxicológicas induzidas pelo produto químico em estudo devem manter-se sem dosagem após o termo da exposição, durante um período não inferior a quatro semanas e não superior a um terço da duração total do estudo.
35. No caso dos roedores, a duração da etapa de carcinogenicidade deste estudo é normalmente de 24 meses, o que representa grande parte do tempo de vida dos animais utilizados. Consoante o tempo de vida dos animais da estirpe de espécie utilizada no estudo, este pode ser mais curto ou mais longo, mas é necessário justificá-lo. No caso de determinadas estirpes de ratinhos (por exemplo, AKR/J, C3H/J ou C57BL/6J), pode ser adequada uma duração do estudo de 18 meses. Seguem-se algumas orientações sobre a duração do estudo, o termo deste



e a sobrevivência. Para mais orientações, nomeadamente no que respeita aos critérios para considerar a carcinogenicidade negativa com base na sobrevivência dos animais estudados, consultar o documento de orientações n.º 116.

- deve ponderar-se pôr termo ao estudo quando o número de sobreviventes do grupo exposto à dose mais baixa ou do grupo de controlo descer abaixo de 25 %.
- se apenas morrerem prematuramente devido a efeitos tóxicos animais do grupo exposto à dose mais elevada, não deve pôr-se termo ao estudo.
- a sobrevivência dos animais deve ser examinada separadamente para cada sexo.
- o estudo não deve prolongar-se além do estágio em que os dados dele extraíveis deixam de ser suficientes para validar uma avaliação estatística.

#### EXAMES (ETAPA DE TOXICIDADE CRÓNICA)

36. Normalmente no início e no final de cada dia, incluindo fins de semana e feriados, deve verificar-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais. Pelo menos uma vez por dia, deve efetuar-se um exame clínico geral, de preferência sempre à(s) mesma(s) hora(s) e, no caso da administração por sonda esofágica, tendo em conta o período previsto de efeitos mais acentuados após a administração do produto químico.
37. Deve efetuar-se um exame clínico aprofundado a cada animal pelo menos uma vez antes da primeira exposição (para poder fazer depois comparações com o estado inicial do animal), no final da primeira semana do estudo e, a partir daí, mensalmente. Os exames devem respeitar um protocolo que minimize as variações entre quem os realiza e não faça depender os resultados do grupo examinado. Estes exames devem ser realizados fora das gaiolas, de preferência num recinto normalizado e sempre à mesma hora. Os resultados destes exames devem ser cuidadosamente registados, de preferência por recurso a um sistema de pontuação claramente definido pelo laboratório em causa. Deve zelar-se por que as condições de exame sejam o mais constantes possível. Entre os sinais a registar contam-se alterações da pele, da pelagem, dos olhos e das mucosas e a ocorrência de secreções, excreções ou reações neurovegetativas (por exemplo, lacrimação, horripilação, alterações da dimensão pupilar ou respiração anormal). Deve também registar-se qualquer alteração da maneira de o animal se mover, da postura e da reação à manipulação, bem como a ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e de comportamentos estereotipados (por exemplo, atos de higiene repetitivos ou movimentação repetitiva em círculo) ou estranhos (automutilação, movimentação para trás, etc.) (32).
38. Recorrendo a um oftalmoscópio ou a dispositivo equivalente, efetua-se um exame oftalmológico a cada animal antes da primeira administração do produto químico em estudo. No termo do estudo, deve efetuar-se este exame de preferência a todos os animais, mas pelo menos aos dos grupos expostos à dose mais elevada e dos grupos de controlo. Se forem detetadas alterações oculares atribuíveis à exposição ao produto químico em estudo, devem examinar-se todos os animais. Se a análise estrutural ou outros elementos indicarem efeitos tóxicos ao nível ocular, deve aumentar-se a frequência dos exames oculares.
39. No caso dos produtos químicos que tenham revelado potencial de indução de efeitos neurotóxicos em estudos anteriores de toxicidade por dose repetida a 28 dias e/ou a 90 dias, poderá, a título facultativo, verificar-se a reatividade sensorial a diversos tipos de estímulos (32) — por exemplo, estímulos auditivos, visuais ou proprioceptivos (33)(34)(35) — e avaliar-se a força de preensão (36) e a atividade motora (37), antes de iniciar o estudo e, a partir daí, de três em três meses, até aos doze meses, inclusive, bem como no termo do estudo (se for além de doze meses). As referências indicadas contêm mais informações sobre a maneira de proceder em cada caso, embora possam adotar-se procedimentos distintos dos nelas descritos.
40. No caso dos produtos químicos que tenham revelado potencial de indução de efeitos imunotóxicos em estudos anteriores de toxicidade por dose repetida a 28 dias e/ou a 90 dias, poderá, a título facultativo, aprofundar-se a investigação deste parâmetro no termo do estudo.

#### *Peso corporal, consumo de alimentos e de água, eficiência alimentar*

41. Todos os animais devem ser pesados no início da exposição, pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Deve medir-se o consumo de alimentos e a eficiência alimentar pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, deve medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Pode ser útil medir o consumo de água também no caso dos estudos em que se verifiquem alterações do comportamento dos animais a esse nível.

*Análises hematológicas e de bioquímica clínica*

42. Nos estudos com roedores, devem ser efetuadas análises hematológicas a todos os animais estudados (dez machos e dez fêmeas de cada grupo) aos três, seis e 12 meses e no termo do estudo (se for além de 12 meses). No caso dos ratinhos, a realização das análises hematológicas necessárias pode exigir o recurso a animais satélites (ver o ponto 19). No caso dos estudos em que não sejam utilizados roedores, colhem-se amostras num número mais reduzido de animais (por exemplo, se a espécie utilizada for o cão, quatro animais de cada sexo, por grupo) em estádios intermédios e no termo do estudo, tal como se indicou para os roedores. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros hematológicos, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses, tanto no caso dos roedores como de outras espécies. As amostras de sangue devem ser colhidas, sob anestesia, num ponto determinado a indicar, por exemplo, por punção cardíaca ou no seio retro-orbital.
43. Devem ser efetuadas as seguintes análises (38): contagem total de leucócitos, fórmula leucocitária, contagem de eritrócitos, contagem de plaquetas, concentração de hemoglobina, hematócrito (volume celular sanguíneo após centrifugação), volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada. Se necessário, em função da toxicidade do produto químico em estudo, poderão analisar-se outros parâmetros hematológicos, tais como os corpos de Heinz e outras anomalias morfológicas dos eritrócitos ou a meta-hemoglobina. Em termos gerais, deve adotar-se uma perspetiva de flexibilidade, dependendo dos efeitos observados e/ou previstos do produto químico em causa. Se este tiver efeitos no sistema hematopoiético, pode ser útil efetuar também a contagem de reticulócitos e uma citologia da medula óssea, embora estas análises não sejam sistematicamente necessárias.
44. Com a mesma cronologia especificada para as análises hematológicas, Devem ser efetuadas análises de bioquímica clínica a amostras de sangue colhidas em todos os animais estudados (dez machos e dez fêmeas de cada grupo), para determinar os principais efeitos tóxicos nos tecidos, nomeadamente ao nível dos rins e do fígado. No caso dos ratinhos, a realização das necessárias análises de bioquímica clínica pode exigir o recurso a animais satélites. No caso dos estudos em que não sejam utilizados roedores, colhem-se amostras num número mais reduzido de animais (por exemplo, se a espécie utilizada for o cão, quatro animais de cada sexo, por grupo) em estádios intermédios e no termo do estudo, tal como se indicou para os roedores. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros de bioquímica clínica, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses, tanto no caso dos roedores como de outras espécies. Recomenda-se o jejum dos animais (exceto dos ratinhos) durante a noite, antes da colheita das amostras de sangue <sup>(1)</sup>. Devem ser efetuadas as seguintes análises (38): glucose, ureia (azoto ureico), creatinina, proteínas totais, albumina, cálcio, sódio, potássio, colesterol total, pelo menos duas análises reveladoras de efeitos hepatocelulares (alanina-aminotransferase, aspartato-aminotransferase, glutamato-desidrogenase, ácidos biliares totais) (39) e, pelo menos, duas análises reveladoras de efeitos hepatobiliares (fosfatase alcalina, gama-glutamil-transferase, 5'-nucleotidase, bilirrubina total, ácidos biliares totais) (39). Se necessário, em função da toxicidade do produto químico em estudo, poderão analisar-se outros parâmetros de química clínica, tais como a colinesterase, hormonas específicas e os triglicéridos em jejum. Em termos gerais, deve adotar-se uma perspetiva de flexibilidade, dependendo dos efeitos observados e/ou previstos do produto químico em causa.
45. Devem ser efetuadas análises de urina a todos os animais estudados (dez machos e dez fêmeas de cada grupo), em amostras colhidas com a mesma cronologia especificada para as análises hematológicas e de química clínica. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros analisados na urina, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses. Uma recomendação de peritos relativa a estudos de patologia clínica (38) inclui a seguinte lista de parâmetros: aspeto, volume, osmolalidade ou densidade, pH, proteínas totais e glucose. Podem também determinar-se os seguintes parâmetros: corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e sangue oculto. Pode ser necessário recorrer ainda a outros parâmetros para investigar melhor os efeitos observados.
46. Em geral, considera-se que, nos estudos em cães, é necessário determinar os valores de base dos parâmetros hematológicos e de bioquímica clínica antes de iniciar a exposição dos animais, o mesmo não sucedendo, porém, no caso dos estudos em roedores (38). Se os dados de base históricos (ver o ponto 58) forem inadequados, pode, no entanto, ser necessário determinar os dados em falta.

## PATOLOGIA

*Autópsia macroscópica*

47. Normalmente, deve ser realizada a todos os animais estudados uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Todavia, pode igualmente prever-se que (no caso dos grupos com destino a eutanásia intercalar e dos grupos satélites) as determinações se limitem a parâmetros fundamentais específicos, por exemplo, de neurotoxicidade ou de imunotoxicidade (ver o ponto 21). Não é necessário autopsiar esses animais nem aplicar-lhes os procedimentos descritos nos pontos seguintes. Fica ao critério do diretor do estudo decidir em que casos é necessário autopsiar animais sentinelas.

<sup>(1)</sup> No caso de algumas determinações no soro e no plasma, nomeadamente da glucose, é aconselhável que os animais jejem durante a noite. O principal motivo desta recomendação reside no facto de que a maior variabilidade dos resultados que inevitavelmente ocorreria se os animais não jejuassem poderia ocultar efeitos subtis e dificultar as interpretações. No entanto, por outro lado, o jejum durante a noite pode interferir no metabolismo geral dos animais, e, particularmente nos estudos realizados com administração pela via alimentar, perturbar a exposição diária ao produto químico em estudo. Os animais devem ser todos avaliados no mesmo estado fisiológico, pelo que é preferível programar as avaliações pormenorizadas e as avaliações neurológicas para um dia diferente do da colheita das amostras para as análises de bioquímica clínica.

48. Deve determinar-se o peso dos órgãos de cada animal, com exceção dos excluídos no ponto 47. Removem-se convenientemente os tecidos aderentes às glândulas suprarrenais, ao encéfalo, aos epidídimos, ao coração, aos rins, ao fígado, aos ovários, ao baço, aos testículos, à tiroide (com as glândulas paratiroides, sendo a pesagem efetuada depois da fixação) e ao útero de todos os animais (exceto os moribundos e/ou os que sejam eutanasiados durante o estudo) e pesa-se cada um destes ainda húmido o mais rapidamente possível depois da dissecação, para evitar que seque.
49. Os tecidos a seguir indicados devem conservar-se no meio de fixação mais adequado ao tipo de tecido em causa e ao exame histopatológico previsto (40) – os tecidos entre parênteses retos são facultativos:

todas as lesões macroscópicas	coração	pâncreas	estômago (pré-estômago, estômago glandular)
glândulas suprarrenais	íleo	glândulas paratiroides	[dentes]
aorta	jejuno	nervo periférico	testículos
encéfalo (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/protuberância anelar)	rins	hipófise	timo
cego	glândulas lacrimais (exo-orbitais)	próstata	tiroide
colo do útero	fígado	reto	[língua]
glândulas de coagulação	pulmões	glândulas salivares	traqueia
cólon	gânglios linfáticos (superficiais e profundos)	vesículas seminais	bexiga urinária
duodeno	glândulas mamárias (obrigatório no caso das fêmeas e, nos machos, se for claramente dissecável)	músculo esquelético	útero, incluindo o colo do útero
epidídimo	[vias respiratórias superiores, incluindo o nariz, os cornetos e os seios paranasais]	pele	[ureteres]
olhos (incluindo a retina)	esófago	medula espinal (a três níveis: cervical, mediotorácico e lombar)	[uretra]
[fémur com articulação]	[bolbo olfativo]	baço	vagina
vesícula biliar (exceto no caso do rato)	ovários	[esterno]	secção da medula óssea e/ou uma punção recente de medula óssea
glândulas de Harder			

No caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem ser ambos conservados. Os resultados clínicos ou outros podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem ser conservados também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indicem que serão provavelmente afetados. Nos estudos por via dérmica, os órgãos a examinar são ainda os constantes da lista relativa à exposição por via oral, mas é necessário proceder igualmente à amostragem e à conservação de pele do local onde o produto químico em estudo foi aplicado. Nos estudos por inalação, a lista de tecidos do aparelho respiratório a conservar e a examinar deve seguir as recomendações dos capítulos B.8 (9) e B.29 (10) deste anexo. A lista de outros órgãos e tecidos a examinar neste caso (além dos tecidos do aparelho respiratório a conservar já especificados) é a estabelecida para a exposição por via oral.

#### *Histopatologia*

50. A referência 40 contém orientações sobre as melhores práticas a seguir na realização de estudos de patologias toxicológicas. Os exames histopatológicos devem incidir, no mínimo, no seguinte:

— todos os tecidos dos animais dos grupos de controlo e dos grupos expostos à dose mais elevada,

- todos os tecidos dos animais que morreram ou foram eutanasiados durante o estudo,
- todos os tecidos com anomalias macroscópicas,
- os tecidos dos órgãos afetados, e os tecidos que revelaram alterações atribuíveis à exposição ao produto químico em estudo nos animais dos grupos expostos à dose mais elevada, de todos os animais de todos os outros grupos expostos a uma dose do produto químico,
- no caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem examinar-se ambos.

#### EXAMES (ETAPA DE CARCINOGENICIDADE)

51. Normalmente no início e no final de cada dia, incluindo fins de semana e feriados, devem verificar-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais. Verifica-se igualmente, uma vez por dia, se os animais têm sinais com importância toxicológica. No caso dos estudos que recorrem à administração por sonda esofágica, os animais devem ser verificados imediatamente após a administração do produto químico. Deve prestar-se especial atenção ao desenvolvimento de tumores, registando-se o tempo decorrido até ao aparecimento destes e o local, as dimensões, o aspeto e a progressão de cada tumor visível na observação macroscópica ou identificável por palpação.
52. Todos os animais devem ser pesados no início da exposição, pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Deve medir-se o consumo de alimentos e a eficiência alimentar pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, deve medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Pode ser útil medir o consumo de água também no caso dos estudos em que se verifiquem alterações do comportamento dos animais a esse nível.

#### *Análises hematológicas e de bioquímica clínica e outras determinações*

53. A fim de extrair um máximo de informações do estudo, sobretudo no que respeita ao modo de ação, fica ao critério do diretor do estudo proceder à colheita de amostras de sangue para análises hematológicas e de bioquímica clínica. Pode também ser útil efetuar análises de urina. Os dados relativos aos animais utilizados na etapa de toxicidade crónica do estudo — a qual normalmente tem a duração de doze meses (ponto 34) — fornecem informações sobre os parâmetros destas análises. Para mais orientações sobre o interesse da colheita das referidas amostras num estudo de carcinogenicidade, consultar o documento de orientações n.º 116 (7). Se forem colhidas amostras de sangue com essa finalidade, deve efetuar-se a colheita no final do período de ensaio, imediatamente antes da eutanásia dos animais ou integrada nesta. As amostras devem ser colhidas, sob anestesia, num ponto determinado a indicar, por exemplo, por punção cardíaca ou no seio retro-orbital. Podem igualmente preparar-se esfregaços de sangue para exame, em especial se o órgão afetado for a medula óssea. Todavia, tem sido questionada (38) a utilidade deste exame de esfregaços de sangue na etapa de carcinogenicidade para a avaliação do potencial cancerígeno/oncogénico.

#### PATOLOGIA

##### *Autópsia macroscópica*

54. Deve ser realizada a todos os animais estudados — exceto os animais sentinelas e outros animais satélites (ver o ponto 20) — uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Fica ao critério do diretor do estudo decidir em que casos é necessário autopsiar animais sentinelas ou outros animais satélites. A pesagem de órgãos normalmente não faz parte dos estudos de carcinogénese, dado que as alterações geriátricas e o desenvolvimento de tumores em fases avançadas diminuem a utilidade dessas pesagens. Todavia, estas pesagens podem ter muita importância nas avaliações baseadas na suficiência da prova, sobretudo no que respeita ao modo de ação. Se fizerem parte de estudos satélites, deve recolher-se estes dados o mais tardar um ano após o início do estudo.
55. Os tecidos a seguir indicados devem conservar-se no meio de fixação mais adequado ao tipo de tecido em causa e ao exame histopatológico previsto (40) — os tecidos entre parênteses retos são facultativos:

todas as lesões macroscópicas	coração	pâncreas	estômago (pré-estômago, estômago glandular)
glândulas suprarrenais	íleo	glândulas paratiroides	[dentes]
aorta	jejuno	nervo periférico	testículos
encéfalo (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/protuberância anelar)	rins	hipófise	timo
cego	glândulas lacrimais (exo-orbitais)	próstata	tiroide

colo do útero	fígado	reto	[língua]
glândulas de coagulação	pulmões	glândulas salivares	traqueia
cólon	gânglios linfáticos (superficiais e profundos)	vesículas seminais	bexiga urinária
duodeno	glândulas mamárias (obrigatório no caso das fêmeas e, nos machos, se for claramente dissecável)	músculo esquelético	útero, incluindo o colo do útero
epidídimo	[vias respiratórias superiores, incluindo o nariz, os cornetos e os seios paranasais]	pele	[ureteres]
olhos (incluindo a retina)	esófago	medula espinal (a três níveis: cervical, mediotorácico e lombar)	[uretra]
[fémur com articulação]	[bolbo olfativo]	baço	vagina
vesícula biliar (exceto no caso do rato)	ovários	[esterno]	secção da medula óssea e/ou uma punção recente de medula óssea
glândulas de Harder			

No caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem conservar-se ambos. Os resultados clínicos ou outros podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem conservar-se também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indicem que serão provavelmente afetados. Nos estudos por via dérmica, os órgãos a examinar são ainda os constantes da lista relativa à exposição por via oral, mas é necessário proceder igualmente à amostragem e à conservação de pele do local onde o produto químico em estudo foi aplicado. Nos estudos por inalação, a lista de tecidos do aparelho respiratório a conservar e a examinar deve seguir as recomendações dos capítulos B.8 (8) e B.29 (9) deste anexo. A lista de outros órgãos e tecidos a examinar neste caso (além dos tecidos do aparelho respiratório a conservar já especificados) é a estabelecida para a exposição por via oral.

#### *Histopatologia*

56. A referência 40 contém orientações sobre as melhores práticas a seguir na realização de estudos de patologias toxicológicas. Os exames devem incidir, no mínimo, nos seguintes tecidos:

- todos os tecidos dos animais dos grupos de controlo e dos grupos expostos à dose mais elevada,
- todos os tecidos dos animais que morreram ou foram eutanasiados durante o estudo,
- todos os tecidos com anomalias macroscópicas, incluindo tumores,
- os tecidos que revelaram alterações histopatológicas atribuíveis à exposição ao produto químico em estudo nos animais dos grupos expostos à dose mais elevada, de todos os animais de todos os outros grupos expostos a uma dose do produto químico,
- no caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem examinar-se ambos.

#### DADOS E RELATÓRIOS (TOXICIDADE CRÓNICA E CARCINOGENICIDADE)

##### **Dados**

57. Deve apresentar-se os dados por animal relativos a todos os parâmetros avaliados. Esses dados devem ainda ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais no início do ensaio, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados, a hora de cada morte ou eutanásia, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, a descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o momento do seu aparecimento e a sua duração e intensidade, o número de animais que apresentaram lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais que apresentaram cada tipo de lesão. Devem constar dos quadros de resumo dos dados as médias e os desvios-padrão (no caso dos dados contínuos) correspondentes aos animais que apresentaram lesões ou efeitos tóxicos, além do grau das lesões.

58. Os dados históricos de controlo podem ser úteis para a interpretação dos resultados do estudo, por exemplo, quando houver indicações de que os dados provenientes dos grupos de controlo em paralelo divergem significativamente de dados recentes referentes a animais de controlo da mesma colónia e da mesma unidade de ensaio. Caso sejam avaliados dados históricos de controlo, estes devem provir do mesmo laboratório, reportar-se a animais da mesma idade e estirpe e ter sido gerados nos cinco anos anteriores ao estudo em causa.
59. Quando pertinente, deve avaliar-se os resultados numéricos por um método estatístico corrente adequado. Os métodos estatísticos e os dados a analisar devem ser escolhidos no planeamento do estudo (ponto 9). Nessa escolha, deve prever-se os ajustamentos em função do grau de sobrevivência que se revelem necessários.
60. Dados a constar do relatório dos ensaios:

*Produto químico em estudo:*

- natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas,
- dados de identificação,
- proveniência,
- número de lote,
- boletim de análises químicas.

*Veículo (se for o caso):*

- justificação da escolha do veículo (se não for água).

*Animais estudados:*

- espécie e estirpe utilizadas e justificação da opção tomada,
- número, idade e sexo dos animais no início dos ensaios,
- proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.,
- peso de cada animal no início do ensaio.

*Condições de realização dos ensaios:*

- fundamentação da via de administração e das doses escolhidas,
- métodos estatísticos utilizados na análise dos dados, se for o caso,
- elementos relativos à formulação do produto químico em estudo/à incorporação do mesmo na dieta fornecida aos animais,
- dados analíticos relativos à concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação,
- via de administração e elementos relativos à administração do produto químico em estudo,
- no caso dos estudos por inalação: exposição unicamente nasal ou de corpo inteiro,
- doses reais (mg/kg de peso corporal/dia) e, se for caso disso, fator de conversão entre a concentração do produto químico em estudo na dieta ou na água de beber (mg/kg ou ppm) e a dose real,
- elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água.

*Resultados (apresentar quadros de resumo dos dados e os dados por animal):*

*Informações gerais*

- dados de sobrevivência,
- pesos corporais e alterações de peso corporal,
- consumo de alimentos, cálculos da eficiência alimentar (se efetuados) e consumo de água (se for caso disso),
- dados toxicocinéticos, se disponíveis,
- resultados oftalmoscópicos, se disponíveis,
- resultados hematológicos, se disponíveis,
- resultados de química clínica, se disponíveis.

*Resultados dos exames clínicos*

- sinais de toxicidade,
- incidência (e, se quantificada, intensidade) das anomalias observadas,
- natureza, intensidade e duração dos sinais clínicos observados (reversíveis ou irreversíveis).

*Dados das autópsias*

- peso corporal terminal,
- peso de cada órgão (e relação com o peso corporal, se for caso disso),
- resultados das autópsias; incidência e intensidade das anomalias.

*Histopatologia*

- observação de efeitos histopatológicos não neoplásicos,
- observação de efeitos histopatológicos neoplásicos,
- correlação entre as observações macroscópicas e os resultados microscópicos,
- descrição pormenorizada dos resultados histopatológicos resultantes da exposição dos animais ao produto químico em estudo, incluindo a classificação de intensidade,
- relatórios do eventual exame das lâminas por pares especialistas.

*Tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.*

*Discussão dos resultados, nomeadamente:*

- discussão dos eventuais modelos,
- relações dose-resposta,
- dados históricos de controlo,

- análise dos dados disponíveis sobre modos de ação,
- determinação das doses de referência, do NOAEL e do LOAEL,
- importância para o ser humano.

Conclusões.

#### REFERÊNCIAS:

- (1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Roma, 1995). Documento de trabalho interno. Environment Directorate, OCDE, Paris.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- (3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. *ATLA* 32:163-208.
- (4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. et al. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 40:145-191.
- (5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206:437-445.
- (6) Capítulo B.27 deste anexo, "Ensaio de toxicidade oral subcrónica — Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias".
- (7) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 — segunda edição. Series on Testing and Assessment No. 116. Disponível no sítio *web* público de *Test Guidelines* da OCDE ([www.oecd.org/env/testguidelines](http://www.oecd.org/env/testguidelines)).
- (8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.
- (9) Capítulo B.8 deste anexo, "Toxicidade subaguda por inalação: Estudo de 28 dias".
- (10) Capítulo B.29 deste anexo, "Toxicidade subcrónica por inalação: Estudo de 90 dias".
- (11) Capítulo B.9 deste anexo, "Toxicidade (dérmica) da dose repetida (28 dias)".
- (12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. *Crit. Rev. in Toxicol.* 36:793-801.
- (13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., Fenner-Crisp P.A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:581-589.
- (14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci.* 89:51-56.
- (15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:591-653.
- (16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. et al. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Crit. Rev. Toxicol.* 36:1-7.



- (17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Crit. Rev. Toxicol.* 36:9-35.
- (18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36:37-68.
- (19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36:69-98.
- (20) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies. Series on Testing and Assessment No. 35; Series on Pesticides No. 14. ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.
- (21) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.
- (22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection. *Crit. Rev. Toxicol.* 37(9):729-837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran J.A. (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N., Lumley C.E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T., Griffiths S.A., Lumley C.E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds.). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast, p. 279-284.
- (26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect* 105:1196-1203.
- (27) Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (JO L 276 de 20.10.2010, p. 33).
- (28) National Research Council (1985). Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, dezembro de 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.
- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.
- (32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (33) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40:999-1003.

- 
- (34) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9:691-704.
- (35) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108:267-283.
- (36) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1:233-236.
- (37) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13:599-609.
- (38) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29:198-201.
- (39) Documento da EMEA (*draft*) "Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity" (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- (40) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32:126-131.
-

## Apêndice 1

## DEFINIÇÃO

**Produto químico em estudo:** qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.»

7) O capítulo B.36 passa a ter a seguinte redação:

## «B.36. TOXICOCINÉTICA

## INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 417 da OCDE (2010). Os estudos toxicocinéticos realizados aos produtos químicos visam obter informações adequadas sobre a absorção, distribuição, biotransformação (metabolismo) e excreção dos mesmos, facilitar o estabelecimento de uma relação entre a concentração ou dose e a toxicidade observada e contribuir para a compreensão do mecanismo através do qual os produtos químicos em causa exercem a sua toxicidade. A toxicocinética pode ajudar a elucidar os estudos toxicológicos, ao demonstrar que a exposição dos animais ao produto químico em estudo é de natureza sistémica e ao revelar quais são as entidades circulantes (produto químico parental ou metabolitos deste). Os parâmetros toxicocinéticos básicos extraídos destes estudos também fornecem informações sobre o potencial de acumulação do produto químico em questão nos tecidos e/ou órgãos e sobre o potencial de indução de biotransformações devidas à exposição ao produto químico em causa.
2. Os dados toxicocinéticos podem ser úteis para apreciar a adequação e pertinência da extrapolação de dados de toxicidade em animais com vista à avaliação de perigos e/ou riscos para o ser humano. Os estudos toxicocinéticos também podem proporcionar informações úteis para a determinação das doses a utilizar em estudos de toxicidade (cinética linear ou não linear), bem como da relação entre a via de administração e os efeitos produzidos, da biodisponibilidade e de outros aspetos, relativos à conceção do estudo. Determinados tipos de dados toxicocinéticos podem servir para construir modelos toxicocinéticos de base fisiológica.
3. Os dados toxicocinéticos e metabólicos são importantes a diversos títulos. Podem, por exemplo, dar indicações acerca de possíveis efeitos tóxicos e modos de ação, bem como sobre a relação destes com as doses e com a via de exposição. Por outro lado, os dados metabólicos podem proporcionar informações úteis para avaliar a importância, no plano toxicológico, da exposição a metabolitos exógenos do produto químico em estudo.
4. Dispor de dados toxicocinéticos adequados ajudará a confirmar a aceitabilidade e aplicabilidade de métodos baseados em relações estrutura-atividade, interpolações e agrupamentos para avaliar a segurança de produtos químicos. Os dados cinéticos também podem servir para avaliar a pertinência toxicológica de outros estudos (por exemplo, *in vivo* e *in vitro*).
5. Salvo indicação em contrário (ver, nomeadamente, os pontos 74 a 78), este método pressupõe a administração por via oral do produto químico em estudo.

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

6. As diversas regulamentações estabelecem exigências e necessidades diferentes quanto aos efeitos e parâmetros toxicocinéticos a medir relativamente a cada classe de produtos químicos (pesticidas, biocidas, produtos químicos industriais, etc.). Contrariamente à maioria dos outros métodos, este método descreve ensaios toxicocinéticos que compreendem múltiplas medições e múltiplos efeitos observados. Futuramente, poderão vir a ser elaborados novos métodos de ensaio e/ou documentos de orientação que individualizem e pormenorizem mais cada efeito observado. No que respeita ao presente método, cada regulamentação estabelece as exigências e/ou necessidades ao nível dos ensaios e avaliações a realizar.
7. São numerosos os estudos que podem ser realizados para avaliar o comportamento toxicocinético de produtos químicos para efeitos da regulamentação aplicável. Todavia, consoante as necessidades ou situações concretas ao nível da regulamentação, nem todos esses estudos poderão ser necessários para avaliar o produto químico em causa. Na conceção de estudos toxicocinéticos é necessário ser flexível e ter em conta as características do produto químico em causa. Em alguns casos, pode ser suficiente explorar um determinado conjunto de questões para atender aos perigos e riscos associados ao produto químico em causa. Por vezes, podem obter-se dados toxicocinéticos no âmbito da avaliação efetuada no quadro de outros estudos toxicológicos. Noutros casos, podem ser necessários estudos toxicocinéticos suplementares e/ou mais aprofundados, se a regulamentação o exigir e/ou se a avaliação do produto químico em causa suscitar novas interrogações.
8. A fim de melhorar a qualidade do estudo e de evitar o recurso desnecessário a animais, antes de realizar o estudo o laboratório deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa e os metabolitos e análogos deste. Entre essas informações podem contar-se dados obtidos por outros métodos de ensaio pertinentes (estudos *in vivo* ou *in vitro* e/ou avaliações *in silico* — ou seja, por simulação computacional). No planeamento do estudo e na interpretação dos resultados pode ser útil ter presente as propriedades

físico-químicas (tais como o coeficiente de partição octano/água, expresso em  $\log P_{OW}$ , o pKa, a hidrossolubilidade, a pressão de vapor e o peso molecular) do produto químico em causa. Estas propriedades podem determinar-se pelos métodos adequados descritos nos métodos de ensaio correspondentes.

#### LIMITAÇÕES

- Este método não se adapta a casos especiais, tais como fêmeas grávidas ou em lactação e progenituras, nem à avaliação de eventuais resíduos em animais destinados à alimentação humana expostos. Todavia, os dados provenientes de estudos pelo método B.36 podem fornecer informações suscetíveis de orientar a conceção de estudos específicos para esses casos. O presente método não se destina ao ensaio de nanomateriais. Um relatório do exame preliminar da aplicabilidade das *Test Guidelines* da OCDE aos nanomateriais (1) indica que a *Test Guideline 417* (equivalente ao presente método) pode não se aplicar a estes materiais.

#### DEFINIÇÕES

- Definem-se no apêndice alguns conceitos utilizados neste método.

#### CONSIDERAÇÕES DE BEM-ESTAR ANIMAL

- O documento de orientações n.º 19 da OCDE (2) contém orientações sobre o tratamento ético dos animais. Recomenda-se a consulta deste documento da OCDE relativamente a todos os estudos *in vivo* e *in vitro* referidos no presente método de ensaio.

#### DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

##### **Estudos-piloto**

- Recomenda-se e incentiva-se a realização de estudos-piloto para escolher os parâmetros experimentais para os estudos de toxicocinética (por exemplo, metabolismo, balanço de massas, protocolos analíticos, dosagens, exalação de CO<sub>2</sub>, etc.). A caracterização de alguns destes parâmetros pode dispensar o recurso a produtos químicos com marcação radioativa.

##### **Escolha dos animais**

###### *Espécie*

- De preferência, a espécie e a estirpe dos animais utilizados nos ensaios de toxicocinética devem ser idênticas às utilizadas nos outros estudos toxicológicos realizados com o produto químico em causa. Normalmente utiliza-se o rato, espécie amplamente usada nos estudos toxicológicos. Pode justificar-se o recurso a outras espécies ou a utilização de espécies adicionais se estudos toxicológicos importantes evidenciarem efeitos tóxicos significativos nessas espécies ou se a toxicidade/toxicocinética nessas espécies for comprovadamente mais pertinente para o ser humano. É necessário justificar a escolha da espécie e da estirpe de animal.
- Salvo menção em contrário, este método pressupõe que a espécie ensaiada é o rato. Se forem utilizadas outras espécies, pode ser necessário alterar determinados aspetos do método.

###### *Idade e estirpe*

- Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis, normalmente com 6 a 12 semanas na altura da exposição (ver também os pontos 13 e 14). É necessário justificar o recurso a animais que não sejam adultos jovens. No início do estudo, os animais devem ter todas idades aproximadas. As diferenças de peso de animal para animal não devem desviar-se mais de 20 % do peso médio de todos os animais do grupo. Idealmente, a estirpe utilizada deve ser idêntica à utilizada para constituir a base de dados toxicológicos do produto químico em causa.

###### *Número e sexo dos animais*

- Para cada dose ensaiada, o número mínimo de animais é de quatro de um dos sexos, sendo necessário justificar o sexo dos animais utilizados. Deve ponderar-se a utilização de animais de ambos os sexos (quatro machos e quatro fêmeas) caso haja indícios de diferenças significativas de toxicidade entre os sexos.

###### *Condições de alojamento e de alimentação*

- Normalmente, os animais são alojados individualmente durante o ensaio. Em circunstâncias especiais, pode justificar-se um alojamento agrupado. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C; a humidade relativa de 30 % a 70 %. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

**Produto químico em estudo**

18. Em todos os aspetos do estudo relacionados com o balanço de massas e com a identificação dos metabolitos, o produto químico utilizado deve estar marcado com o isótopo radioativo  $^{14}\text{C}$ . Todavia, se puder demonstrar-se que:

- é possível efetuar o balanço de massas e identificar os metabolitos utilizando o produto químico sem marcação radioativa,
- a especificidade e a sensibilidade analíticas do método sem o produto químico com marcação radioativa são iguais ou superiores às que se obteriam com marcação radioativa,

não será necessário utilizar um produto químico com marcação radioativa. Por outro lado, podem utilizar-se outros isótopos radioativos ou estáveis, especialmente se o elemento em questão for a causa da toxicidade ou integrar a parte tóxica do produto químico em estudo. Se possível, o marcador radioativo deve localizar-se numa parte central da molécula que seja estável ao metabolismo (não permutável, não metabolizada em  $\text{CO}_2$  nem passa a fazer parte dos radicais monocarbonados do organismo). Para discernir o destino metabólico do produto químico em estudo, pode ser necessário marcar vários pontos ou determinadas regiões da sua molécula.

19. É necessário determinar o grau de pureza e identificar os produtos químicos com e sem marcação radioativa recorrendo a métodos de análise adequados. A pureza radiológica de um produto químico radioativo deve ser a máxima atingível no caso desse produto químico (idealmente superior a 95 %) e deve fazer-se um esforço razoável para identificar as impurezas cuja concentração seja igual ou superior a 2 %. O grau de pureza, bem como a identidade e a proporção das impurezas identificadas, devem constar do relatório. Determinados programas obrigatórios podem optar por fornecer orientações suplementares para a definição e caracterização dos produtos químicos constituídos por misturas, bem como de métodos para determinação da pureza.

**Escolha das doses***Estudo-piloto*

20. Normalmente, é suficiente no estudo-piloto uma dose única por via oral. A dose não deve ser tóxica, mas deve ser suficientemente elevada para possibilitar a identificação dos metabolitos nas excreções (e no plasma, se for caso disso), assim como para a consecução dos objetivos do estudo-piloto, expressos no ponto 12.

*Estudos principais*

21. Nos estudos principais, é preferível ensaiar pelo menos duas doses, dado que as informações obtidas a partir desse número mínimo de grupos de dose podem facilitar a escolha das doses a ensaiar noutros estudos de toxicidade, bem como a avaliação da relação dose-resposta em ensaios de toxicidade já realizados.
22. Se forem administradas duas doses, ambas devem ser suficientemente elevadas para possibilitar a identificação dos metabolitos nas excreções (e no plasma, se for caso disso). Na escolha das doses devem ponderar-se as informações extraíveis dos dados de toxicidade disponíveis. Caso não se disponha de informações (provenientes, por exemplo, de estudos de toxicidade aguda por via oral nos quais se registem sinais clínicos de toxicidade ou de estudos de toxicidade por dose repetida), pode ponderar-se, para dose mais elevada, um valor inferior à estimativa da  $\text{DL}_{50}$  (vias oral e dérmica) ou à estimativa da  $\text{CL}_{50}$  (via inalatória) ou um valor inferior ao valor mais baixo do intervalo de toxicidade aguda estimado. A dose mais baixa deve ser uma fração da dose mais elevada.
23. Caso o estudo incida apenas numa dose, idealmente esta deve ser suficientemente elevada para possibilitar a identificação dos metabolitos nas excreções (e no plasma, se for caso disso), sem gerar efeitos tóxicos visíveis. Se não for ensaiada uma segunda dose, é necessário justificá-lo.
24. Se for necessário determinar o efeito da dose nos processos cinéticos, duas doses podem não ser suficientes e pelo menos uma das doses utilizadas deve ser suficientemente elevada para saturar esses processos. Uma evolução não linear da área abaixo da curva da concentração no plasma em função do tempo (AUC) entre duas doses utilizadas no estudo principal constitui indício forte da saturação de um ou mais processos cinéticos algures entre essas duas doses.
25. No caso dos produtos químicos de baixa toxicidade, deve utilizar-se uma dose máxima de 1 000 mg/kg de peso corporal pelas vias oral ou dérmica; se a administração for por via inalatória, ver orientações no capítulo B.2 deste anexo, mas normalmente a dose máxima não excederá 2 mg/l. Por razões específicas ligadas ao produto químico em estudo, pode ser necessária uma dose mais elevada, consoante o exija a regulamentação aplicável. É sempre necessário justificar as doses escolhidas.

26. Os dados toxicocinéticos e de distribuição pelos tecidos obtidos a partir de uma dose única podem ser suficientes para determinar o potencial de acumulação e/ou de persistência. Todavia, em determinadas circunstâncias, pode ser necessário administrar repetidamente a dose, para melhor avaliar o potencial de acumulação e/ou de persistência ou a evolução dos parâmetros toxicocinéticos (por exemplo, a indução e a inibição enzimáticas) ou para responder às exigências da regulamentação aplicável. Nos estudos com repetição de doses, é normalmente suficiente utilizar doses baixas, mas, em determinadas circunstâncias, também pode ser necessário utilizar doses elevadas (ver também o ponto 57).

#### **Administração do produto químico em estudo**

27. Deve dissolver-se o produto químico em estudo, ou preparar-se uma suspensão homogénea do mesmo, no mesmo veículo utilizado nos outros estudos de toxicidade oral com administração por sonda esofágica efetuados com o produto químico em causa, se esse veículo for conhecido. É necessário justificar o veículo escolhido. A escolha do veículo e do volume de dosagem são aspetos a considerar na conceção do estudo. O método habitual de administração é por sonda esofágica. Todavia, em determinadas situações, pode ser vantajoso proceder à administração por meio de uma cápsula de gelatina ou por incorporação na dieta, sendo necessário justificar ambas as opções. É igualmente necessário dispor de meios de verificação da dose efetivamente administrada a cada animal.
28. O volume máximo de líquido a administrar de cada vez por meio de sonda esofágica depende do tamanho do animal, do tipo de veículo de dosagem e da suspensão ou não da alimentação antes da administração do produto químico em estudo. É necessário explicar por que razão se mantém ou se restringe a alimentação antes da administração das doses. Normalmente, o volume utilizado deve ser o menor possível, tanto no caso dos veículos aquosos como dos veículos não aquosos. No caso dos roedores, o volume das doses não deve, normalmente, exceder 10 mg/kg de peso corporal. No caso dos produtos químicos mais lipofílicos, o volume do veículo pode ser de 4 ml/kg de peso corporal ou superior. Nos casos de administração repetida das doses, em que o jejum diário seria contraindicado, pode ponderar-se utilizar volumes de dose inferiores (por exemplo, 2 a 4 ml/kg de peso corporal). Se possível, deve procurar utilizar-se volumes de dose coerentes com os administrados noutros estudos orais por sonda esofágica do produto químico em causa.
29. A administração intravenosa do produto químico em estudo e a medição do teor deste no sangue e/ou nas excreções pode servir para determinar a biodisponibilidade ou a absorção oral relativa. Nos estudos por via intravenosa, administra-se uma dose única (normalmente equivalente à dose mais baixa por via oral, sem a exceder — ver a escolha das doses) do produto químico num veículo adequado. Administra-se a dose num volume adequado (por exemplo, 1 ml/kg de peso corporal), no local de administração escolhido, a, pelo menos, quatro animais do sexo adequado (caso se justifique, podem utilizar-se animais de ambos os sexos — ver o ponto 16). É necessário dissolver completamente ou preparar uma suspensão integral da dose do produto químico em estudo a administrar por via intravenosa. O veículo utilizado nesta via de administração não deve interferir no fluxo sanguíneo nem afetar as células sanguíneas. Se o produto químico em estudo for injetado por meio de bombagem, é necessário indicar no relatório a velocidade de perfusão e esta deve ser normalizada para todos os animais. Caso se proceda à encanulação da veia jugular (para administração do produto químico em estudo e/ou para colheita de sangue) ou se utilize a artéria femoral para a administração do produto químico, é necessário anestesiá-lo animal. Há que ponderar bem o tipo de anestesia, dado que esta pode influenciar a toxicocinética. Os animais devem poder restabelecer-se convenientemente antes de lhes ser administrado o produto químico em estudo incorporado no veículo.
30. No caso de determinados produtos químicos, pode recorrer-se a outras vias de administração, como as vias dérmica ou inalatória (ver os pontos 74 a 78), em função das propriedades físico-químicas do produto químico em causa e da utilização ou exposição humanas previsíveis.

#### **Medições**

##### *Balanço de massas*

31. Estabelece-se o balanço de massas somando as quantidades correspondentes às percentagens da dose (radioativa) administrada excretadas na urina, nas fezes e no ar expirado e as quantidades correspondentes às percentagens presentes nos tecidos, na carcaça restante e nas águas de lavagem da gaiola (ver o ponto 46). Em geral, consideram-se adequadas recuperações totais do produto químico (radioatividade) administrado superiores a 90 %.

##### *Absorção*

32. Pode efetuar-se uma primeira estimativa da absorção excluindo do balanço de massas as quantidades correspondentes à percentagem da dose presente no trato gastrointestinal e/ou nas fezes. Para o cálculo da percentagem de absorção, ver o ponto 33. Para a análise das excreções, ver os pontos 44 a 49. Se não for possível determinar com exatidão, por meio de um balanço de massas, a absorção subsequente a uma administração por via oral (por exemplo, se mais de 20 % da dose administrada estiver presente nas fezes), podem ser necessários estudos mais aprofundados. Estes estudos podem compreender a administração oral do produto químico e a determinação deste na biliar ou a administração oral e intravenosa do produto químico e a determinação da diferença entre as quantidades deste presentes na urina, no ar expirado e na carcaça, depois de administrado por cada uma destas vias. Em ambos os casos, mede-se a radioatividade em vez de efetuar uma análise química específica do produto químico em estudo e dos seus metabolitos.
33. Para estudar a excreção biliar, normalmente procede-se à administração por via oral. Neste estudo, insere-se uma cânula no ducto biliar de, pelo menos, quatro animais do sexo adequado (ou, caso se justifique, de ambos os sexos), procedendo-se à administração de uma única dose do produto químico em estudo. Depois desta administração, deve monitorizar-se a excreção de radioatividade/do produto químico em estudo na biliar durante o tempo necessário para estimar a percentagem da dose administrada que é excretada por esta via, a qual se pode utilizar para calcular, em seguida, a percentagem de absorção por via oral:

Percentagem de absorção = (quantidade presente na bÍlis + na urina + no ar expirado + na carcaça, com exclusão da quantidade presente no trato gastrointestinal)/quantidade administrada × 100

34. No caso de determinadas classes de produtos químicos, a dose absorvida pode ser diretamente segregada através das membranas intestinais. Nesses casos, a determinação da percentagem da dose administrada presente nas fezes após administração de uma dose por via oral a ratos com uma cânula inserida no ducto biliar não se considera representativa da dose não absorvida. Recomenda-se que, nos casos em que se preveja secreção intestinal, se calcule a percentagem da dose que é absorvida a partir de um cálculo da absorção por comparação da excreção após administração por via oral e por via intravenosa (ratos intactos ou com uma cânula inserida no ducto biliar) — ver o ponto 35. Recomenda-se igualmente que, se for considerado necessário quantificar a secreção intestinal, se meça a excreção após administração por via intravenosa em ratos com uma cânula inserida no ducto biliar.

#### *Biodisponibilidade*

35. Pode determinar-se a biodisponibilidade a partir da cinética no plasma/no sangue dos grupos expostos por via oral e por via intravenosa, conforme se descreve nos pontos 50 a 52, efetuando análises químicas específicas do produto químico em estudo e/ou do(s) metabolito(s) correspondente(s) e dispensando-se, portanto, a marcação radioativa do produto químico em causa. Pode então calcular-se a biodisponibilidade (F) do produto químico em estudo ou do(s) metabolito(s) correspondente(s) do seguinte modo:

$$F = (AUC_{\text{exp}}/AUC_{\text{IV}}) \times (Dose_{\text{IV}}/Dose_{\text{exp}})$$

em que AUC é a área abaixo da curva de concentração no plasma em função do tempo e "exp" é a via experimental (oral, dérmica ou inalatória).

36. A fim de avaliar o risco de efeitos sistémicos, é geralmente preferível recorrer à biodisponibilidade do componente tóxico, em vez da percentagem de absorção, para comparar as concentrações sistémicas em estudos efetuados em animais com dados análogos de biomonitorização provenientes de estudos de exposição profissional. A situação pode tornar-se mais complexa se as doses se situarem numa zona de resposta não linear, pelo que é importante que um estudo toxicocinético prévio permita escolher uma gama de doses com resposta linear.

#### *Distribuição pelos tecidos*

37. O conhecimento da distribuição pelos tecidos do produto químico em estudo e/ou dos metabolitos do mesmo é importante para a identificação dos tecidos-alvo e para a compreensão dos mecanismos subjacentes à toxicidade, bem como para obter informações sobre o potencial de acumulação e persistência do produto químico e dos metabolitos. Pelo menos no termo do estudo de excreção (normalmente até sete dias após a administração da dose, em função do comportamento do produto químico em estudo), deve medir-se a percentagem da dose (radioativa) total presente nos tecidos e na carcaça restante. Caso não se detete o produto químico nos tecidos no final do estudo (por exemplo, por aquele ter sido eliminado anteriormente, devido a uma meia vida curta), importa não interpretar mal os dados. Nessas situações, é necessário examinar a distribuição pelos tecidos quando se atinge a concentração máxima do produto químico (e/ou dos metabolitos) no plasma/no sangue ( $T_{\text{max}}$ ) ou a taxa máxima de excreção urinária (ver o ponto 38). Além disso, pode ser necessário colher tecidos noutros momentos para determinar a distribuição do produto químico em estudo (e/ou dos metabolitos) pelos tecidos, para avaliar a eventual dependência do tempo, para facilitar o balanço de massas e/ou se a autoridade competente o exigir. Entre os tecidos a colher contam-se o fígado, gordura, o trato gastrointestinal, os rins, o baço, o sangue total, a carcaça restante, os órgãos-alvo e quaisquer outros (por exemplo, a tireoide, eritrócitos, os órgãos reprodutores, a pele e — sobretudo em animais pigmentados — os olhos) potencialmente importantes para a avaliação toxicológica do produto químico em estudo. Deve-se procurar examinar o máximo de tecidos nos mesmos momentos, para otimizar a utilização dos animais e no caso de, em estudos de toxicidade crónica ou subcrónica, se observarem efeitos tóxicos em órgãos-alvo. Deve indicar-se igualmente no relatório as concentrações do resíduo (radioativo) e a relação entre essas concentrações nos tecidos e no plasma (no sangue).
38. A avaliação da distribuição pelos tecidos noutros momentos, tais como o momento em que são atingidos o pico de concentração no plasma/no sangue (por exemplo,  $T_{\text{max}}$ ) ou a taxa máxima de excreção urinária, obtida, respetivamente, nos ensaios cinéticos do plasma/do sangue e nos ensaios de excreção urinária, também pode ser uma exigência das autoridades competentes. As informações neste domínio podem facilitar a compreensão da toxicidade e do potencial de acumulação e persistência do produto químico em estudo e dos metabolitos. É necessário justificar a escolha das amostras. As amostras a analisar são geralmente as já indicadas (ver o ponto 37).
39. Nos estudos da distribuição pelos tecidos, pode quantificar-se a radioatividade procedendo à dissecação, homogeneização, combustão e/ou solubilização dos órgãos e depois à contagem da cintilação em fase líquida dos resíduos retidos. Determinadas técnicas, atualmente em diversos estádios de desenvolvimento — por exemplo, a autorradiografia quantitativa de corpo inteiro e a autorradiografia microscópica dos recetores —, podem ser úteis para determinar a distribuição do produto químico em estudo pelos órgãos e/ou tecidos (3)(4).
40. Se a via de exposição não for a via oral, deve colher-se e analisar-se determinados tecidos específicos, tais como os pulmões, nos estudos por inalação, e a pele, nos estudos por via dérmica. Ver os pontos 74 a 78.

*Metabolismo*

41. É necessário recolher as excreções (e, se for caso disso, colher amostras de plasma) para proceder à identificação e quantificação do produto químico inalterado e dos metabolitos do mesmo, como se descreve nos pontos 44 a 49. Para facilitar a identificação dos metabolitos, aceita-se a reunião das excreções de um determinado grupo de dose. Recomenda-se que se estabeleça o perfil dos metabolitos correspondente a cada período do estudo. Todavia, se a falta de amostras e/ou de radioatividade o inviabilizar, aceita-se a reunião da urina e das fezes correspondentes a diversos momentos do estudo, mas não das correspondentes aos dois sexos ou a doses diferentes. Na análise da urina, das fezes, da radioatividade presente no ar expirado pelos animais expostos e da bÍlis devem ser utilizados métodos qualitativos e quantitativos adequados.
42. Deve fazer-se um esforço razoável para identificar os metabolitos presentes em concentrações iguais ou superiores a 5 % da dose administrada e para traçar um esquema metabólico do produto químico em estudo. Se a quantidade do produto químico em estudo nas excreções representar 5 % ou mais da dose administrada, é necessário que o produto químico seja aí identificado. Entende-se por "identificação" a determinação da estrutura exata dos componentes. Normalmente, procede-se à identificação efetuando simultaneamente um traçado cromatográfico (cocromatografia) do metabolito e de padrões conhecidos, por dois sistemas diferentes, ou recorrendo a técnicas que permitam determinar a estrutura, tais como a espetrometria de massa, a ressonância magnética nuclear e outras. No caso da cocromatografia, não se considera que o recurso a técnicas cromatográficas que utilizem a mesma fase estacionária com dois sistemas de solventes diferentes constitua uma verificação por dois métodos adequada da identidade dos metabolitos, dado que os métodos não seriam independentes. A identificação por cocromatografia deve processar-se mediante o recurso a dois sistemas diferentes e independentes no plano analítico, tais como a cromatografia em camada fina normal ou com inversão de fases e a HPLC (cromatografia em fase líquida de alta eficiência). Se a qualidade da separação cromatográfica for adequada, não é necessária uma confirmação por meios espetroscópicos. Para uma identificação inequívoca, também pode recorrer-se a métodos que forneçam informações estruturais, tais como cromatografia em fase líquida/espetrometria de massa, cromatografia em fase líquida/espetrometria de massa, seguida de nova espetrometria de massa (em tandem), cromatografia em fase gasosa/espetrometria de massa e espetrometria de ressonância magnética nuclear.
43. Se não for possível identificar os metabolitos que representem, individualmente, 5 % ou mais da dose administrada, deve constar do relatório final uma justificação ou explicação disso. Pode ser útil identificar metabolitos que representem menos de 5 % da dose administrada, para melhorar a compreensão da via metabólica com vista à avaliação dos perigos e/ou riscos associados ao produto químico em estudo. Sempre que possível, deve apresentar-se uma confirmação da estrutura. Para isso, pode ser necessário estabelecer o perfil metabólico no plasma, no sangue ou noutros tecidos.

*Excreção*

44. Para conhecer a taxa e o grau de excreção da dose administrada, determina-se a percentagem da dose (radioativa) recuperada na urina, nas fezes e no ar expirado, dados que também são necessários para o balanço de massas. Devem determinar-se as quantidades do produto químico em estudo (radioatividade) eliminadas na urina, nas fezes e no ar expirado a intervalos de tempo adequados (ver os pontos 47 a 49). Os ensaios por dose repetida devem ser concebidos de maneira a possibilitarem a recolha de dados de excreção para cumprir convenientemente os objetivos descritos no ponto 26, o que permitirá efetuar comparações com os ensaios de dose única.
45. Se um estudo-piloto tiver revelado que não são excretadas no ar expirado quantidades significativas (de acordo com o ponto 49) do produto químico (radioatividade), não é necessário recolher o ar expirado no estudo definitivo.
46. Para a recolha das excreções (urina, fezes e ar expirado), coloca-se cada animal numa unidade individual de estudo do metabolismo. No final de cada período de recolha (ver os pontos 47 a 49), lavam-se essas unidades com um solvente adequado ("lavagem da gaiola"), para máxima recuperação do produto químico em estudo (da radioatividade). A recolha das excreções deve terminar ao sétimo dia ou quando tiverem sido recolhidos 90 % da dose administrada, consoante o que ocorrer primeiro.
47. Deve determinar-se a quantidade total do produto químico em estudo (radioatividade) na urina em dois momentos, pelo menos, do primeiro dia de recolha — um dos quais 24 horas após a administração da dose — e posteriormente uma vez por dia, até ao termo do estudo. Incentiva-se que, no primeiro dia, haja mais de dois momentos de recolha (por exemplo, às 6, 12 e 24 horas). Devem analisar-se os resultados dos estudos-piloto a fim de tirar ilações sobre momentos de recolha diferentes ou suplementares. É necessário fundamentar os programas de recolha.
48. Deve determinar-se diariamente a quantidade total do produto químico em estudo (radioatividade) nas fezes, com início 24 horas após a administração da dose e até ao termo do estudo, a menos que os estudos-piloto aconselhem momentos de recolha diferentes ou suplementares. É necessário fundamentar programas de recolha diferentes.
49. Caso se detete menos de 1 % da dose administrada no ar expirado num período de 24 horas, pode cessar-se a recolha do CO<sub>2</sub> expirado e de outros produtos voláteis no estudo em curso.



### Estudos em função do tempo

#### *Cinética no plasma/no sangue*

50. Estes estudos visam obter estimativas dos principais parâmetros toxicocinéticos – por exemplo,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ , meia vida ( $t_{1/2}$ ) e AUC – do produto químico em estudo. Podem efetuar-se com a administração de uma dose única, mas geralmente administram-se duas ou mais doses. A escolha das doses depende da natureza do ensaio e/ou do aspeto em estudo. Os dados cinéticos podem ser necessários para resolver questões como a da biodisponibilidade do produto químico e/ou para elucidar o efeito da dose na eliminação (por exemplo, para verificar se a saturação da eliminação depende ou não da dose).
51. O número mínimo de animais a utilizar nestes estudos é de quatro animais de um dos sexos por grupo de dose. É necessário justificar o sexo dos animais utilizados. Deve ponderar-se a utilização de animais de ambos os sexos (quatro machos e quatro fêmeas) caso haja indícios de diferenças significativas de toxicidade entre os sexos.
52. Após a administração do produto químico em estudo (com marcação radioativa), devem colher-se amostras de sangue de cada animal em momentos adequados e segundo um método apropriado. O volume e o número de amostras de sangue que podem colher-se em cada animal podem estar limitados pelos efeitos potenciais de colheitas sucessivas na saúde/fisiologia do animal e/ou pela sensibilidade do método analítico. Devem analisar-se amostras correspondentes a cada animal. Em determinadas circunstâncias (por exemplo, a caracterização de metabolitos), pode ser necessário reunir amostras colhidas em diversos animais. Essa reunião de amostras deve ser justificada e as amostras dela resultantes devem ser claramente identificadas. Caso se utilize um produto químico com marcação radioativa, pode justificar-se determinar a radioatividade total presente. Se assim for, deve determinar-se a radioatividade total no sangue total e no plasma, ou no plasma e nos eritrócitos, para cálculo da razão sangue/plasma. Noutras situações, podem ser necessários estudos mais específicos que passem pela identificação de compostos parentais e/ou de metabolitos ou pela avaliação da fixação a proteínas.

#### *Outros estudos cinéticos em tecidos*

53. Estes estudos visam obter informações sobre a evolução no tempo, para elucidar questões relacionadas com aspetos como o modo da ação tóxica, a bioacumulação e a biopersistência, mediante a determinação dos níveis do produto químico em estudo em diversos tecidos. A escolha dos tecidos e o número de momentos a avaliar dependerão do aspeto a elucidar e da base de dados toxicológicos disponível para o produto químico. Na conceção destes estudos cinéticos complementares em tecidos, devem ser tidos em conta as informações reunidas conforme se descreveu nos pontos 37 a 40. Estes estudos podem efetuar-se com uma única dose ou repetindo a dose. É necessário justificar pormenorizadamente as opções tomadas.
54. Entre as razões que podem justificar a realização de outros estudos cinéticos em tecidos contam-se as seguintes:
- meia vida prolongada no sangue, indiciadora da possível acumulação do produto químico em estudo em diversos tecidos,
  - interesse em verificar se foi atingido um estado estacionário em determinados tecidos (por exemplo, em estudos por dose repetida, embora a concentração do produto químico em estudo no sangue possa aparentemente ter atingido um estado estacionário, pode ser útil confirmar se também se atingiu uma concentração estacionária nos tecidos-alvo).
55. Neste tipo de estudos em função do tempo, deve administrar-se por via oral uma dose adequada do produto químico em causa a, pelo menos, quatro animais por dose e por ponto temporal, medindo-se a distribuição ao longo do tempo nos tecidos escolhidos. Podem utilizar-se animais todos do mesmo sexo, a menos que os efeitos tóxicos observados evidenciem alguma especificidade sexual. Também consoante o aspeto a elucidar, assim se analisarão ou não a radioatividade total ou o produto químico parental e/ou os metabolitos. Avalia-se a distribuição pelos tecidos recorrendo a técnicas adequadas.

#### *Indução/inibição enzimáticas*

56. Num ou mais dos seguintes casos pode ser necessário estudar eventuais efeitos de indução/inibição enzimáticas ou a biotransformação do produto químico em estudo:
- 1) Se houver indícios de uma relação entre a biotransformação do produto químico e o aumento da toxicidade do mesmo;
  - 2) Se os dados de toxicidade disponíveis revelarem uma relação não linear entre a dose e o metabolismo;
  - 3) Se os estudos de identificação dos metabolitos tiverem identificado um metabolito potencialmente tóxico que possa ter sido produzido por uma via enzimática induzida pelo produto químico em estudo;
  - 4) Para explicar efeitos supostamente ligados a fenómenos de indução enzimática;

- 5) No caso de experiências *in vitro* ou *in vivo* com espécies e condições diferentes, se forem observadas alterações toxicológicas significativas do perfil metabólico do produto químico em estudo, situação em que pode ser necessário caracterizar a(s) enzima(s) em causa (por exemplo, enzimas da fase I, tais como as isoenzimas do sistema das mono-oxigenases dependentes do citocromo P450, enzimas da fase II, tais como isoenzimas da sulfotransferase ou da uridina-difosfato-glucuronosiltransferase, ou qualquer outra enzima pertinente). Estas informações podem ser utilizadas para avaliar a pertinência da espécie em causa para extrapolações interessantes.
57. Para avaliar variações toxicocinéticas ligadas ao produto químico em estudo, devem ser utilizados protocolos de estudo adequados, devidamente validados e fundamentados. Constituem exemplos desses estudos a administração repetida de doses do produto químico não marcado, seguida de uma dose única com marcação radioativa ao décimo quarto dia, ou a administração repetida de doses do produto químico com marcação radioativa, seguida da colheita de amostras ao primeiro, sétimo e décimo quarto dias para determinação dos perfis metabólicos. A administração repetida de doses do produto químico em estudo com marcação radioativa também pode fornecer informações sobre a bioacumulação (ver o ponto 26).

#### OUTRAS ABORDAGENS

58. Além das experiências *in vivo* descritas no presente método, há outras possibilidades de obter informações úteis sobre a absorção, a distribuição, o metabolismo ou a eliminação de produtos químicos em determinadas espécies.

#### Utilização de dados obtidos *in vitro*

59. Utilizando sistemas de ensaio adequados, podem estudar-se *in vitro* diversos aspetos relativos ao metabolismo de um produto químico. Podem utilizar-se hepatócitos recentemente isolados ou de cultura ou frações subcelulares (por exemplo, microsomas e citosol ou a fração S9) hepáticas para estudar possíveis metabolitos. O metabolismo local no órgão-alvo — por exemplo, os pulmões — pode ter interesse para a avaliação dos riscos. As frações microsómicas de tecidos-alvo podem ser úteis para esse efeito. Os estudos com microsomas podem ter utilidade para investigar eventuais diferenças entre os sexos ou relacionadas com o estágio vital e para caracterizar parâmetros enzimáticos ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) que podem facilitar a avaliação de dependências entre o metabolismo e as doses de exposição. Por outro lado, os microsomas podem ser úteis na identificação das enzimas microsomáticas que participam no metabolismo do produto químico em estudo, aspeto que pode ser importante para as extrapolações interespecies (ver também o ponto 56). Pode igualmente examinar-se o potencial de indução de biotransformação utilizando frações subcelulares hepáticas (por exemplo, os microsomas e o citosol) de animais pré-expostos ao produto químico em causa, através de estudos de indução de hepatócitos *in vitro* ou a partir de linhagens celulares específicas que exprimam as enzimas pertinentes. Em determinadas circunstâncias e em condições adequadas, pode ponderar-se a utilização de frações subcelulares provenientes de tecidos humanos para determinar eventuais diferenças entre espécies ao nível da biotransformação. Os resultados de estudos *in vitro* também podem ter utilidade no desenvolvimento de modelos toxicocinéticos de base fisiológica (5).
60. A partir de estudos *in vitro* de absorção por via dérmica podem obter-se informações suplementares para caracterização da absorção (6).
61. Pode utilizar-se culturas primárias de células hepáticas e cortes recentes de tecidos para estudar aspetos semelhantes aos estudados com os microsomas hepáticos. Em certos casos, poderão elucidar-se determinadas questões utilizando linhagens celulares que exprimam especificamente a enzima em causa, ou linhagens celulares geneticamente modificadas. Noutros casos, pode ser útil estudar *in vitro* a inibição e indução de isozimas específicas do citocromo P450 (por exemplo, CYP1A1, 2E1, 1A2, etc.), e/ou de enzimas da fase II, pelo composto parental. As informações obtidas podem ser úteis para compostos com estrutura semelhante.

#### Utilização como informação complementar de dados toxicocinéticos provenientes de estudos de toxicidade

62. A análise de amostras de sangue, tecidos e/ou excreções obtidas noutros estudos de toxicidade pode fornecer dados sobre a biodisponibilidade, a evolução da concentração no plasma ao longo do tempo (AUC,  $C_{max}$ ), o potencial de bioacumulação, as velocidades de eliminação e diferenças metabólicas ou cinéticas ligadas ao sexo ou ao estágio vital.
63. Pode efetuar-se adaptações ao nível da conceção do estudo para elucidar questões relacionadas com a saturação das vias de absorção, de biotransformação e de excreção a doses elevadas, com o funcionamento de novas vias metabólicas a essas doses ou com o confinamento dos metabolitos tóxicos a tais doses.
64. Outros aspetos ligados à avaliação dos perigos que podem ser examinados:
- sensibilidade dependente da idade, devido a diferenças no estado da barreira hemato-encefálica, ao nível renal e/ou nas capacidades de desintoxicação,
  - sensibilidade de determinadas subpopulações devido a diferentes capacidades de biotransformação ou a outras diferenças toxicocinéticas,
  - grau de exposição fetal por transferência transplacentária do produto químico ou grau de exposição neonatal através da lactação.

### Utilização de modelos toxicocinéticos

65. Os modelos toxicocinéticos podem ser úteis para diversos aspetos da avaliação dos perigos e dos riscos, por exemplo, na previsão da exposição sistémica e da dose transmitida aos tecidos internos. Estes modelos também podem ter utilidade para elucidar determinadas questões relativas ao modo de ação, podendo servir de base para extrapolações interespécies, vias de exposição e perfis de dosagem, bem como para avaliar o risco para o ser humano. Entre os dados úteis para o desenvolvimento de modelos toxicocinéticos de base fisiológica para um produto químico numa determinada espécie contam-se 1) os coeficientes de partição, 2) as constantes bioquímicas e os parâmetros fisiológicos, 3) os parâmetros de absorção específicos da via de exposição e 4) dados cinéticos *in vivo* para aferição dos modelos – por exemplo, parâmetros de eliminação para as vias de excreção pertinentes (> 10 %) ou  $K_m$  e  $V_{max}$  para o metabolismo. Os dados experimentais utilizados no desenvolvimento de modelos devem ser obtidos por métodos cientificamente consistentes e os resultados da aplicação dos modelos devem ser validados. Para facilitar o desenvolvimento de modelos não compartimentais ou de base fisiológica, determinam-se frequentemente parâmetros específicos do produto químico em estudo ou da espécie em causa, tais como taxas de absorção, o coeficiente de repartição entre o sangue e os tecidos e as constantes metabólicas.

### DADOS E RELATÓRIOS

66. Recomenda-se que o relatório do estudo tenha um índice.

### Corpo do relatório

67. O corpo do relatório deve estar organizado nas seguintes secções e subsecções e conter as informações previstas no presente método:

#### *Resumo*

68. Deve resumir a conceção do estudo e descrever os métodos utilizados. Deve igualmente salientar os principais resultados, nomeadamente os relativos ao balanço de massas, à natureza e importância dos metabolitos, aos resíduos nos tecidos, à taxa de eliminação, ao potencial de bioacumulação e às diferenças entre os sexos. Deve ser suficientemente pormenorizado para possibilitar a avaliação dos resultados.

#### *Introdução*

69. Deve compreender os objetivos, os fundamentos e a conceção do estudo, bem como as referências pertinentes e os eventuais elementos históricos.

#### *Objetos e métodos do estudo*

70. Deve descrever pormenorizadamente todas as informações pertinentes, nomeadamente:

a) Produto químico em estudo

Relativamente à identificação do produto químico, deve compreender a denominação química, a estrutura molecular, a composição química qualitativa e quantitativa, o grau de pureza química e, se possível, o tipo e a quantidade de cada impureza. Deve compreender igualmente informações sobre as propriedades físico-químicas, nomeadamente o estado físico, a cor, a solubilidade bruta e/ou o coeficiente de partição, a estabilidade e, se for caso disso, a corrosividade. Se aplicável, devem ser fornecidos elementos relativos aos isómeros. Se o produto químico em estudo tiver marcação radioativa, deve indicar-se o tipo de radionúclido, a posição do marcador, a atividade específica e o grau de pureza radioquímica.

É igualmente necessário indicar o tipo de cada veículo, diluente, agente de suspensão, emulsionante ou qualquer outra matéria utilizada para administrar o produto químico em estudo, ou descrevê-los.

b) Animais estudados

Deve compreender informações sobre os animais estudados, nomeadamente: escolha da espécie e da estirpe e justificação da escolha, idade no início do estudo, sexo, peso corporal, estado de saúde e manutenção dos animais.

c) Métodos

Deve explicar a conceção do estudo e o método utilizado e incidir nos seguintes elementos:

- 1) Justificação das alterações da via ou das condições de exposição eventualmente efetuadas;

- 2) Justificação das doses escolhidas;
  - 3) Descrição dos estudos-piloto eventualmente utilizados na conceção experimental dos estudos subsequentes, incluindo os dados de base provenientes dos primeiros;
  - 4) Modo de preparação da solução administrada e tipo de solvente ou veículo, se tiver sido utilizado algum;
  - 5) Número de grupos expostos e número de animais por grupo;
  - 6) Nível e volume das doses (e a atividade correspondente, caso se utilize marcação radioativa);
  - 7) Via(s) e métodos de administração;
  - 8) Frequência da administração;
  - 9) Período de jejum (se for o caso);
  - 10) Radioatividade total por animal;
  - 11) Manipulação dos animais;
  - 12) Colheita e tratamento das amostras;
  - 13) Métodos analíticos utilizados na separação, quantificação e identificação de metabolitos;
  - 14) Limites de deteção dos métodos utilizados;
  - 15) Outras medições e protocolos experimentais utilizados (incluindo a validação dos métodos de análise dos metabolitos).
- d) Análise estatística

Caso os resultados do estudo sejam objeto de análise estatística, devem incluir-se informações suficientes sobre o método de análise estatística e o programa informático utilizados para o efeito, para que um avaliador ou perito estatístico independente possa reexaminar e reconstituir a análise.

Se o estudo recorrer a modelos sistémicos, por exemplo, modelos toxicocinéticos de base fisiológica, os modelos utilizados devem ser descritos em pormenor, para que possam ser reconstituídos e validados de forma independente (ver o ponto 65 e o apêndice "Definições").

#### *Resultados*

71. Os dados devem ser resumidos e ser apresentados em quadros, juntamente com uma avaliação estatística adequada, e ser complementados por uma explicação no campo de texto correspondente. Os dados das contagens de radioatividade devem ser resumidos e ser apresentados da maneira mais adequada ao estudo – normalmente em microgramas ou miligramas equivalentes por massa de amostra, embora possam utilizar-se outras unidades. Devem inserir-se gráficos ilustrativos dos resultados, reproduzir-se os dados cromatográficos e espetrométricos representativos, identificar-se e quantificar-se os metabolitos, especificando a estrutura molecular dos mesmos, e propor-se as vias metabólicas correspondentes. Esta secção deve ainda conter os seguintes elementos que se justifiquem:

- 1) Quantidade e percentagem de recuperação de radioatividade na urina, nas fezes, no ar expirado e na lavagem (urina e fezes) da gaiola;
  - nos estudos por via dérmica, devem incluir-se igualmente dados relativos à recuperação do produto químico em estudo na pele exposta e nas lavagens da pele, dados relativos à radioatividade residual na cobertura de proteção da pele e na unidade metabólica e os resultados do estudo de lavagem da pele. Para mais informações, ver os pontos 74 a 77,
  - nos estudos por via inalatória, devem incluir-se igualmente dados relativos à recuperação do produto químico em estudo nos pulmões e nos tecidos nasais (8). Para mais informações, ver o ponto 78;

- 2) Distribuição pelos tecidos, expressa em percentagem da dose administrada e em concentração (microgramas equivalentes por grama de tecido), e razões tecido/sangue e tecido/plasma;
- 3) Balanço de matérias referente a cada estudo no qual sejam analisados os tecidos corporais e as excreções;
- 4) Concentrações no plasma e parâmetros toxicocinéticos (biodisponibilidade, AUC,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ , eliminação, meia vida) depois da administração pela(s) via(s) de exposição correspondente(s);
- 5) Taxa e grau de absorção do produto químico em estudo depois da administração pela(s) via(s) de exposição correspondente(s);
- 6) Quantidades do produto químico em estudo e de metabolitos (em percentagem da dose administrada) recolhidas nas excreções;
- 7) Referência aos dados por animal apresentados em apêndice para todos os parâmetros medidos (por exemplo, dose administrada, percentagem de recuperação, concentrações, parâmetros toxicocinéticos, etc.);
- 8) Figura com as vias metabólicas propostas e com as estruturas moleculares dos metabolitos.

#### *Discussão e conclusões*

#### 72. Elementos a constar desta secção:

- 1) Proposta de via metabólica baseada nos resultados do metabolismo e da eliminação do produto químico em estudo;
  - 2) Discussão das eventuais diferenças ligadas à espécie ou ao sexo no que respeita à eliminação e/ou biotransformação do produto químico em estudo;
  - 3) Quadros e discussão relativos à identificação e importância dos metabolitos, às taxas de eliminação, ao potencial de bioacumulação e ao nível de resíduos do composto parental e/ou do(s) metabolito(s) deste nos tecidos, bem como a eventuais alterações dos parâmetros toxicocinéticos em função da dose;
  - 4) Dados toxicocinéticos pertinentes obtidos em estudos de toxicidade;
  - 5) Conclusão concisa, fundamentada nos resultados do estudo;
  - 6) As subsecções suplementares eventualmente necessárias.
73. Pode inserir-se outras secções para incluir informações bibliográficas, quadros, figuras, apêndices, etc. complementares.

#### VIAS ALTERNATIVAS DE EXPOSIÇÃO

##### **Via dérmica**

##### *Exposição por via dérmica*

74. Esta secção é dedicada aos estudos toxicocinéticos de produtos químicos administrados por via dérmica. No que respeita à absorção por esta via, consultar o capítulo B.44, "Absorção cutânea: método *in vivo*" (9) deste anexo. Para outros critérios, como a distribuição e o metabolismo, pode recorrer-se ao presente método. Na exposição por via dérmica pode utilizar-se um ou mais níveis de dose do produto químico em estudo. Este (por exemplo, o produto químico puro, uma diluição do mesmo ou uma formulação que o contenha, a aplicar na pele) deve ser o produto químico ao qual as pessoas ou outras espécies potencialmente afetadas poderão estar expostas, ou um substituinte realista do mesmo. O nível ou níveis de dose devem escolher-se conforme foi explicado nos pontos 20 a 26. São fatores a ter em conta na escolha da(s) dose(s) a administrar por via dérmica a exposição humana prevista e/ou as doses que se revelaram tóxicas noutros estudos de toxicidade por via dérmica. Se necessário, a dose ou doses a administrar por via dérmica devem ser dissolvidas num veículo adequado, sendo em seguida administrado(s) o(s) volume(s) adequado(s) da(s) dose(s). Pouco antes do início do ensaio, cortam-se os pelos da região dorsal dos animais. Caso se rapem os pelos com uma lâmina, esta operação deve ser efetuada cerca de 24 horas antes do ensaio. Ao cortar ou rapar os pelos do animal, é necessário tomar precauções para evitar lesões da pele que possam alterar a permeabilidade desta. A percentagem da superfície do corpo do animal da qual se devem eliminar os pelos para a aplicação do produto químico em estudo é de aproximadamente 10 %. Se o

produto químico em causa for muito tóxico, a superfície exposta pode ser inferior a 10 %, mas deve cobrir-se com uma camada fina e uniforme o máximo possível de superfície. A superfície exposta deve ser a mesma para todos os grupos de animais que participam no ensaio por via dérmica. As superfícies expostas devem ser protegidas com uma cobertura adequada que não saia do lugar. Os animais devem ser alojados separadamente.

75. Para determinar a quantidade da dose do produto químico em estudo aplicada que pode remover-se da pele lavando a superfície de pele exposta com um sabão suave e água, efetua-se um estudo de lavagem da pele. Este estudo também pode ser útil para estabelecer o balanço de massas quando o produto químico for administrado por via dérmica. Para realizar um estudo de lavagem da pele, aplica-se uma dose única do produto químico em causa a dois animais. Escolhe-se a dose de acordo com o ponto 23 do presente método (relativamente ao tempo de contacto com a pele, ver o ponto 76). Para avaliar a eficácia da remoção do produto químico em estudo por este método de lavagem, determinam-se as quantidades do mesmo nas águas de lavagem.
76. A menos que a corrosividade o inviabilize, uma vez aplicado, o produto químico em estudo deve manter-se em contacto com a pele durante, pelo menos, seis horas. Uma vez retirada a cobertura de proteção, lava-se a superfície exposta conforme se explicou para o estudo de lavagem da pele no ponto 75. Em seguida, pesquisam-se resíduos do produto químico em estudo na cobertura de proteção e nas águas de lavagem. No final dos ensaios, eutanasiam-se os animais de acordo com a referência 2 e remove-se-lhes a pele exposta. Em seguida, analisa-se uma secção adequada dessa pele para determinar os resíduos do produto químico em estudo (a radioatividade) nela presentes.
77. Para a avaliação toxicocinética de produtos farmacêuticos, podem ser necessários protocolos diferentes, em observância da regulamentação aplicável.

#### **Via inalatória**

78. Deve utilizar-se uma concentração única do produto químico em estudo, embora possam utilizar-se mais, se for necessário. A concentração ou concentrações devem escolher-se conforme foi explicado nos pontos 20 a 26. A exposição por inalação deve efetuar-se com um cone nasal ou com um capacete, para evitar absorções por outras vias (8). Se as condições de exposição por inalação forem diferentes, é necessário justificar e documentar as alterações. Deve precisar-se a duração da exposição (normalmente de quatro a seis horas).

#### **REFERÊNCIAS:**

- (1) OCDE (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15. ENV/JM/MONO(2009)21, OCDE, Paris.
- (2) OCDE (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane End-points for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000), OCDE, Paris.
- (3) Solon E.G., Kraus L. (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance. *J. Pharm. and Tox. Methods* 46:73-81.
- (4) Stumpf W.E. (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. *J. Pharmacological and Toxicological Methods* 51:25-40.
- (5) Loizou G., Spendiff M., Barton H.A., Bessems J., Bois F.Y., d'Yvoire M.B., Buist H., Clewell H.J. 3rd, Meek B., Gundert-Remy U., Goerlitz G., Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 50:400 – 411.
- (6) Capítulo B.45 deste anexo, "Absorção cutânea: Método *in vitro*".
- (7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No. 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.
- (8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

- 
- (9) Capítulo B.44 deste anexo, "Absorção cutânea: Método *in vivo*".
- (10) Barton H.A., *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36:9-35.
- (11) Gibaldi M., Perrier D., (1982), Pharmacokinetics, 2.<sup>a</sup> edição. Marcel Dekker, Inc., New York.
-

## Apêndice

## DEFINIÇÕES

**Absorção:** processo ou processos através dos quais um produto químico atravessa tecidos ou neles penetra. Diz respeito ao composto parental e a todos os metabolitos deste. Não confundir com "biodisponibilidade".

**Acumulação** (bioacumulação): aumento ao longo do tempo da quantidade do produto químico presente nos tecidos (em geral tecidos adiposos, após exposição repetida). Se a quantidade do produto químico que penetra no corpo exceder a quantidade que dele é eliminada, o produto químico acumula-se no organismo e pode atingir concentrações tóxicas.

**ADME:** acrónimo de "Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção".

**AUC** (área abaixo da curva de concentração no plasma em função do tempo): área abaixo da curva que representa a evolução da concentração do produto químico no plasma ao longo do tempo. Corresponde à quantidade do produto químico absorvida pelo corpo num período determinado. Em condições de linearidade, esta área (do tempo zero a infinito) é proporcional à quantidade total do produto químico absorvida pelo corpo, independentemente da taxa de absorção.

**Autorradiografia** (autorradiografia de corpo inteiro): esta técnica, que serve para determinar quantitativa e/ou qualitativamente a localização nos tecidos de um produto químico radioativo, utiliza películas de raios X ou, mais recentemente, recorre à imagiologia digital com placas fotoluminescentes para visualizar moléculas ou fragmentos de moléculas com marcação radioativa através do registo da radiação emitida no interior do objeto estudado. Comparativamente à dissecação de órgãos, a autorradiografia quantitativa de corpo inteiro pode apresentar algumas vantagens na determinação da distribuição do produto químico em estudo e na avaliação da resolução e da recuperação total das matérias radioativas nos tecidos. Uma vantagem significativa, por exemplo, é que esta técnica pode ser utilizada num modelo com animais pigmentados para avaliar a eventual associação do produto químico em estudo à melanina, que pode ligar-se a certas moléculas. Todavia, embora constitua um meio cómodo de visualizar globalmente os sítios de fixação de grande capacidade e baixa afinidade em todo o corpo, esta técnica pode ter limitações na identificação de sítios-alvo específicos como os da fixação ao recetor, cuja deteção exige resolução e sensibilidade relativamente elevadas. Quando se recorre à autorradiografia, as experiências destinadas a estabelecer o balanço de massas do composto administrado devem realizar-se num grupo ou estudo distintos, separadamente do estudo da distribuição pelos tecidos, procedendo-se à homogeneização de todas as excreções (incluindo, eventualmente, o ar expirado) e das carcaças completas e à análise das mesmas por contagem da cintilação em fase líquida.

**Excreção biliar:** excreção pelas vias biliares.

**Bioacumulação:** ver "acumulação".

**Biodisponibilidade:** fração de uma dose administrada que atinge a circulação sistémica ou é disponibilizada no sítio da atividade fisiológica. Em geral, a biodisponibilidade de um produto químico refere-se ao composto parental, mas pode igualmente referir-se a metabolitos deste. Diz respeito apenas a uma forma química. *Nota importante:* biodisponibilidade e absorção não são sinónimos. A diferença entre, por exemplo, a absorção oral (isto é, presença na parede intestinal e na circulação portal) e a biodisponibilidade (isto é, presença no sangue sistémico e nos tecidos) pode, entre outros fatores, advir da degradação química devida ao metabolismo da parede intestinal, ao efluxo para o lúmen intestinal ou ao metabolismo pré-sistémico no fígado (10). A biodisponibilidade do componente tóxico (composto parental ou metabolito) é um parâmetro essencial na avaliação dos riscos para a saúde humana (extrapolação de doses elevadas para doses baixas, extrapolação de uma via para outra) para a determinação do valor interno correspondente a um NOAEL (nível sem observação de efeitos adversos) externo ou a uma dose de referência externa (dose aplicada). Para estudar os efeitos no fígado em caso de administração oral, é suficiente a absorção oral. Todavia, para estudar efeitos não localizados na porta de entrada, a biodisponibilidade é geralmente um parâmetro mais fiável para a avaliação dos riscos do que a absorção.

**Biopersistência:** ver "persistência".

**Biotransformação:** conversão química (geralmente enzimática) no corpo do produto químico em causa num produto químico diferente. É sinónimo de "metabolismo".

**C<sub>max</sub>:** concentração máxima (pico de concentração) no sangue (plasma/soro) após a administração ou excreção máxima (pico de excreção urinária ou fecal) após a administração.

**Velocidade de eliminação:** medição quantitativa da taxa, por unidade de tempo, à qual o produto químico em estudo é removido do sangue, do plasma ou de determinado tecido.

**Compartimento:** porção (ou unidade) estrutural ou bioquímica de um corpo, tecido ou célula separada do resto do corpo, do resto do tecido ou do resto da célula.

**Vias de desintoxicação:** séries de etapas conducentes à eliminação de produtos químicos tóxicos do corpo, seja por transformação metabólica seja por excreção.



**Distribuição:** dispersão de um produto químico e dos seus derivados num organismo.

**Enzimas/isoenzimas:** proteínas que catalisam reações químicas. As isoenzimas são enzimas que catalisam reações químicas semelhantes, mas diferem na sequência de aminoácidos.

**Parâmetros enzimáticos:**  $K_m$ , constante de Michaelis; e  $V_{max}$ , velocidade máxima.

**Excreção:** processo ou processos através dos quais um produto químico administrado e/ou os metabolitos deste são eliminados do corpo.

**Exógeno:** de origem exterior ao organismo ou sistema ou produzido fora dele.

**Extrapolação:** inferência de um ou mais valores desconhecidos com base no que é conhecido ou se observou.

**Meia vida ( $t_{1/2}$ ):** tempo necessário para que a concentração do produto químico em estudo num compartimento diminua para metade. Refere-se geralmente à concentração no plasma ou à quantidade do produto químico em estudo presente em todo o corpo.

**Indução/Indução enzimática:** síntese de enzimas em resposta a um estímulo ambiental ou a uma molécula indutora.

**Linearidade/Cinética linear:** um processo diz-se de cinética "linear" se todas as transferências entre compartimentos forem proporcionais às quantidades ou concentrações presentes, isto é, forem de primeira ordem. Os volumes de eliminação e de distribuição, bem como as meias-vidas, são, portanto, constantes. As concentrações atingidas são proporcionais à dose (exposição) e a acumulação é mais facilmente previsível. Pode aferir-se da linearidade/não linearidade comparando os parâmetros pertinentes — por exemplo, a área abaixo da curva — após doses diferentes ou após uma exposição única e repetidas exposições. A inexistência de uma dependência da dose pode indicar a saturação das enzimas que intervêm no metabolismo do composto em causa; o aumento da área abaixo da curva após exposição repetida, comparativamente a uma exposição única, pode indicar inibição metabólica; a diminuição da área abaixo da curva pode indicar indução metabólica (ver também a referência 11).

**Balanço de massas:** contabilidade das entradas e saídas do sistema do produto químico em estudo.

**Balanço material:** ver "balanço de massas".

**Mecanismo (modo) de toxicidade/Mecanismo (modo) de ação:** o mecanismo de ação refere-se às interações bioquímicas específicas através das quais o produto químico em estudo produz os seus efeitos. O modo de ação refere-se aos fenómenos mais gerais através dos quais se manifesta a toxicidade do produto químico.

**Metabolismo:** é sinónimo de "biotransformação".

**Metabolitos:** produtos do metabolismo ou de processos metabólicos.

**Absorção oral:** percentagem da dose do produto químico em estudo absorvida a partir do sítio de administração (trato gastrointestinal). Este parâmetro essencial pode servir para compreender que fração do produto químico administrado atinge a veia porta e, a seguir, o fígado.

**Coefficiente de partição:** também conhecido por "coeficiente de distribuição", mede a diferença de solubilidades do produto químico em dois solventes.

**Níveis sanguíneos (plasmático/sérico) máximos:** concentração máxima (pico de concentração) no sangue (plasma/soro) após a administração do produto químico (ver também " $C_{max}$ ").

**Persistência (biopersistência):** presença duradoura de um produto químico (num sistema biológico) devido a resistência deste à degradação/eliminação.

**Interpolação:** utilização dos dados relativos a um determinado parâmetro disponíveis para um ou mais produtos químicos na previsão do resultado referente ao mesmo parâmetro para o produto químico em estudo.

**Autorradiografia microscópica dos recetores** (ou microautorradiografia dos recetores): técnica que pode servir para estudar interações xenobióticas com determinados sítios de tecidos ou populações celulares, por exemplo, em estudos de fixação ao recetor ou de modo de ação específico que possam necessitar de resolução e sensibilidade elevadas, impossíveis de obter por técnicas como a autorradiografia de corpo inteiro.

**Via de administração** (oral, intravenosa, dérmica, inalatória, etc.): refere-se aos meios pelos quais os produtos químicos são administrados ao corpo (por exemplo, por via oral através de sonda esofágica, por via oral através da dieta, por via dérmica, por inalação, por via intravenosa, etc.).

**Saturação:** estado no qual um ou mais processos cinéticos (por exemplo, a absorção, o metabolismo ou a eliminação) estão no máximo (ou seja, saturados).

**Sensibilidade:** capacidade de um método ou de um instrumento de distinguir medições correspondentes a níveis diferentes de resposta da variável em causa.

**Estado estacionário dos níveis sanguíneos (plasmáticos):** estado fora do equilíbrio de um sistema aberto no qual todas as forças exercidas no sistema são exatamente contrabalançadas por forças opostas, de maneira que todos os componentes do sistema têm uma concentração estacionária, embora fluam matérias pelo sistema.

**Modelação sistémica** (modelo toxicocinético de base fisiológica, modelo de base farmacocinética, modelo farmacocinético de base fisiológica, modelo de base biológica, etc.): modelo abstrato que utiliza linguagem matemática para descrever o comportamento de um sistema.

**Tecidos-alvo:** tecido no qual se manifesta o principal efeito adverso do produto tóxico.

**Produto químico em estudo:** qualquer produto químico ou mistura ao qual seja aplicado este método de ensaio.

**Distribuição nos tecidos:** circulação reversível do produto químico em estudo de um ponto para outro do corpo. Esta distribuição pode estudar-se por dissecação, homogeneização, combustão ou contagem da cintilação em fase líquida dos órgãos ou por autorradiografia qualitativa e/ou quantitativa de corpo inteiro. A primeira via é útil para determinar concentrações e percentagens de recuperação em tecidos e na restante carcaça de um animal, mas pode não ter resolução suficiente em todos os tecidos e a recuperação global pode não ser a ideal (< 90 %). Ver abaixo a definição da outra via.

$T_{max}$ : tempo necessário para atingir  $C_{max}$ .

**Toxicocinética** (farmacocinética): Estudo de absorção, da distribuição, do metabolismo e da excreção de produtos químicos ao longo do tempo.

**Validação de modelos:** processo de avaliar se um modelo descreve convenientemente os dados toxicocinéticos disponíveis. Pode avaliar-se modelos por comparação estatística ou visual, com valores experimentais, das previsões que permitem fazer, em função de uma variável independente comum (por exemplo, o tempo). A amplitude da avaliação deve ser compatível com a utilização pretendida do modelo.»

8) É aditado o seguinte capítulo B.52:

#### «B.52. TOXICIDADE AGUDA POR INALAÇÃO — MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA

##### INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline 436* (2009) da OCDE. O primeiro método relativo à toxicidade aguda por inalação (*Test Guideline TG 403*) foi adotado em 1981 e posteriormente revisto — ver o capítulo B.2 (1) deste anexo. Depois da adoção de uma revisão do Método de Classificação de Toxicidade Aguda — capítulo B.1.tris deste anexo (5) —, justificava-se dispor de um método de classificação de toxicidade aguda por inalação (2)(3)(4). Uma avaliação retrospectiva deste método de classificação de toxicidade aguda por inalação revelou que o mesmo se adequa à utilização para efeitos de classificação e rotulagem (6). Neste método sequencial recorre-se a séries de concentrações visadas fixas para classificar a toxicidade de produtos químicos. Embora o parâmetro fundamental seja a letalidade, os animais que apresentem sinais de dor intensa, de grande aflição, em sofrimento ou moribundos devem ser eutanasiados, para lhes minimizar o sofrimento. O *Guidance Document* n.º 19 da OCDE (7) contém orientações sobre os parâmetros eticamente mensuráveis.
2. O *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing* (GD 39) (8) contém orientações para a realização e interpretação deste método de ensaio.
3. No apêndice 1 e no referido GD 39 (8) definem-se alguns conceitos utilizados neste método.
4. Este método permite obter informações sobre as propriedades perigosas e possibilita o escalonamento e a classificação de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 de produtos químicos causadores de toxicidade aguda (9). Caso sejam necessárias estimativas numéricas de valores de  $CL_{50}$  ou análises da resposta à concentração, o método adequado a utilizar é o descrito no capítulo B.2 (1) este anexo. Para mais orientações sobre a escolha do método de ensaio, consultar o documento GD 39 (8). Este método não se destina especificamente ao ensaio de materiais especiais, tais como matérias fibrosas ou isométricas pouco solúveis ou nanomateriais manufacturados.

#### CONSIDERAÇÕES INICIAIS

5. Antes de proceder a ensaios segundo este método, o laboratório deve ter em conta os elementos disponíveis sobre o produto químico, nomeadamente estudos já efetuados cujos resultados eventualmente dispensem a realização de mais ensaios, a fim de minimizar a utilização de animais. Entre os elementos úteis para a escolha da espécie, da estirpe, do sexo, do modo de exposição e das concentrações mais adequados contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, resultados de ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana e dados (Q)SAR — "(quantitative) structure-activity relationships", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins. Não deve ensaiar-se por este método concentrações que presumivelmente causarão dor ou sofrimento intensos, devido a efeitos corrosivos <sup>(1)</sup> ou fortemente irritantes [ver o GD 39 (8)].

#### PRINCÍPIO DO MÉTODO

6. Com base num processo sequencial, obtêm-se informações sobre a toxicidade aguda do produto químico em estudo por inalação durante um período de exposição de quatro horas que são suficientes para o classificar. Por razões ligadas à regulamentação aplicável, a duração da exposição pode ser diferente. São ensaiados três animais de cada sexo em cada uma das etapas de concentração definidas. Consoante a mortalidade e/ou o número de animais moribundos, podem bastar duas etapas para ajuizar da toxicidade aguda do produto químico em estudo. Caso se verifique que um dos sexos é mais sensível do que o outro, pode prosseguir-se o ensaio apenas com o sexo mais sensível. O resultado de uma etapa determina o que fazer a seguir:
  - a) Não são necessários mais ensaios;
  - b) Ensaia-se três animais de cada sexo; ou
  - c) Ensaia-se seis animais apenas do sexo mais sensível — a estimativa do limite inferior da classe de toxicidade deve basear-se no ensaio de seis animais (independentemente do sexo) por grupo de concentração em estudo.
7. Os animais moribundos ou que apresentem sinais óbvios de dor ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados e, na interpretação dos resultados do ensaio, ser considerados do mesmo modo que os animais que morrem no ensaio. O documento de orientações n.º 19, relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (7), define os critérios que devem presidir à decisão de eutanasiar animais moribundos ou em grande sofrimento, bem como orientações sobre o reconhecimento da morte previsível ou iminente.

#### DESCRIÇÃO DO MÉTODO

##### Escolha da espécie animal

8. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. A espécie preferida é o rato. É necessário justificar a utilização de outras espécies.

##### Preparação dos animais

9. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas. No dia da exposição, os animais devem ser adultos jovens com oito a 12 semanas, de peso corporal não desviado mais de 20 % do peso médio correspondente a cada sexo dos animais da mesma idade anteriormente expostos. Os animais devem ser selecionados aleatoriamente e marcados para identificação individual. Para aclimação às condições laboratoriais, devem permanecer nas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início do ensaio. Durante um curto período antes do ensaio, também devem ser aclimatados ao dispositivo de ensaio, para diminuir a tensão causada por um ambiente novo.

##### Manutenção dos animais

10. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. O ideal será manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, embora isto possa não ser possível ao utilizar água como veículo. Antes e depois das exposições, os animais são geralmente engaiolados por sexo e por concentração, mas o número de animais por gaiola não deve dificultar a clara observação de cada animal e deve minimizar as perdas devidas a lutas ou canibalismo. Quando se opta pela exposição unicamente nasal dos animais, pode ser necessário aclimatá-los aos tubos de contenção. Estes não devem provocar aos animais tensões físicas, térmicas ou dinâmicas excessivas. A contenção dos animais pode afetar parâmetros fisiológicos como a temperatura corporal (hipertermia) e/ou o volume respirado por minuto. Caso se disponha de dados genéricos reveladores de que nenhuma destas alterações ocorre em grau apreciável, não será necessária a preadaptação aos tubos de contenção. Os animais cujo corpo seja exposto na totalidade a um aerossol devem permanecer em gaiolas individuais durante a exposição, para evitar que o aerossol seja filtrado pela pelagem dos que com eles coabitam. Exceto nos períodos de exposição, podem utilizar-se dietas

<sup>(1)</sup> A avaliação da corrosividade pode basear-se na apreciação de especialistas na matéria, tendo designadamente em conta elementos relativos a experiências em peões ou animais, dados *in vitro* disponíveis — por exemplo, provenientes dos capítulos B.40 (10) ou B.40.A (11) deste anexo ou do *Test Guideline 425* da OCDE (12) —, valores de pH, informações relativas a produtos químicos similares ou outros dados pertinentes.

convencionais certificadas de laboratório, com fornecimento ilimitado de água potável da rede pública. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão.

#### **Câmaras de inalação**

11. Ao escolher-se a câmara de inalação, deve ter-se em conta a natureza do produto químico em estudo e o objetivo do ensaio. Privilegia-se o modo de exposição unicamente nasal, termo que abrange as exposições "unicamente da cabeça", "unicamente do nariz" e "unicamente do focinho". A exposição unicamente nasal é geralmente preferida no estudo de aerossóis de líquidos ou de sólidos, ou de vapores que possam condensar-se e formar aerossóis. Para determinados objetivos do estudo, poderá ser melhor recorrer ao modo de exposição de corpo inteiro, mas será necessário justificá-lo no relatório. Para garantir estabilidade atmosférica nas câmaras de corpo inteiro, o volume de todos os animais presentes em cada câmara não deve exceder 5 % do volume da câmara. O documento GD 39 (8) descreve os princípios, vantagens e desvantagens das técnicas de exposição unicamente nasal e de corpo inteiro.

#### **CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO**

##### **Administração das concentrações**

12. Recomenda-se que a exposição tenha uma duração fixa de quatro horas, excluído o tempo para se estabelecer o equilíbrio. Em determinadas circunstâncias, podem ser necessários outros tempos de exposição, havendo que justificá-lo no relatório do estudo [ver o GD 39 (8)]. Os animais expostos em câmaras de corpo inteiro devem ser alojados individualmente, para evitar que animais coabitantes ingiram o produto químico em estudo ao lamberem-se uns aos outros. Durante o período de exposição, a alimentação deve ser suspensa. Durante as exposições de corpo inteiro pode continuar a fornecer-se água.
13. Os animais são expostos ao produto químico em estudo sob a forma de gás, vapor, aerossol ou de uma mistura destes. O estado físico a ensaiar depende das propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, da concentração escolhida e/ou da forma física cuja probabilidade de presença durante a manipulação e utilização do mesmo seja maior. Os produtos químicos higroscópicos ou quimicamente reativos devem ser ensaiados em atmosfera seca. Deve tomar-se precauções para evitar concentrações que possam provocar explosões.

##### **Distribuição granulométrica**

14. Os aerossóis e os vapores que possam condensar-se em aerossóis devem ser objeto de análise granulométrica. Para que todas as zonas pertinentes do aparelho respiratório sejam expostas, recomenda-se a utilização de aerossóis com diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) compreendido entre 1 µm e 4 µm e desvio-padrão geométrico ( $\sigma_g$ ) compreendido entre 1,5 e 3,0 (8)(13)(14). Deve fazer-se o razoavelmente possível para respeitar estas condições, sendo necessário um parecer especializado caso isso não se consiga. Por exemplo, as partículas dos fumos metálicos podem ser mais pequenas do que o limite inferior indicado e as partículas carregadas, as fibras e as matérias higroscópicas (que aumentam de volume no ambiente húmido do aparelho respiratório) podem exceder o limite superior.

##### **Incorporação do produto químico em estudo num veículo**

15. Pode utilizar-se um veículo para obter a concentração e a granulometria adequadas do produto químico na atmosfera. Regra geral, deve preferir-se a água. As matérias em partículas podem ser sujeitas a processos mecânicos destinados a obter a distribuição granulométrica necessária, mas tendo o cuidado de não decompor nem alterar o produto químico em estudo. Quando houver indícios de que um processo mecânico possa ter alterado a composição do produto químico em estudo (por exemplo, devido às altas temperaturas geradas pela fricção numa moagem excessiva), será necessário verificá-la por meios analíticos. Devem tomar-se as precauções adequadas para não contaminar o produto químico em estudo. Não é necessário ensaiar matérias granulosas não friáveis intencionalmente formuladas para não serem inaláveis. Para demonstrar que a manipulação de uma matéria granulosa não gera partículas respiráveis, efetua-se um ensaio de desgaste. Se este gerar partículas respiráveis, deve realizar-se um ensaio de toxicidade por inalação.

##### **Animais de controlo**

16. Não é necessário um grupo de controlo negativo (do ar) em paralelo. Caso se utilize um veículo diverso da água para gerar a atmosfera a ensaiar, só se utilizará um grupo de controlo do veículo se não se dispuser de dados históricos de toxicidade por inalação. Se um estudo de toxicidade de um produto químico incorporado num determinado veículo não revelar toxicidade, conclui-se que o veículo em causa não é tóxico à concentração ensaiada, não sendo necessário nenhum grupo de controlo do veículo.

#### **MONITORIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO**

##### **Caudal de ar nas câmaras**

17. Durante cada exposição, é necessário regular cuidadosamente, monitorizar continuamente e registar pelo menos de hora a hora o caudal de ar através de cada câmara. A monitorização da concentração (ou estabilidade) da atmosfera em estudo constitui uma medida permanente de todos os parâmetros dinâmicos e um meio indireto

de regular os que intervêm na geração da atmosfera em estudo. É necessário ter especial cuidado em evitar reinalações nas câmaras de exposição unicamente nasal, evitando que o fluxo de ar através do sistema de exposição seja incapaz de produzir uma circulação dinâmica da atmosfera que contém o produto químico em estudo. Existem metodologias a que pode recorrer-se para demonstrar que não ocorrem reinalações nas condições experimentais escolhidas (8)(15). A concentração de oxigénio não deve ser inferior a 19 % e a concentração de dióxido de carbono não deve exceder 1 %. Se houver razões para crer que estas concentrações não são respeitadas, é necessário medi-las.

#### **Temperatura e humidade relativa nas câmaras**

18. Deve manter-se a temperatura nas câmaras a  $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ . Tanto no caso das exposições unicamente nasais como das exposições do corpo inteiro, é necessário monitorizar a humidade relativa na zona de respiração dos animais e registá-la pelo menos três vezes (duração do ensaio até quatro horas) ou de hora a hora (durações mais curtas). O ideal seria manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, mas isso pode não ser possível (por exemplo, quando se estudam misturas aquosas) ou pode não ser mensurável (devido a interferências do produto químico em estudo com o método de ensaio).

#### **Concentração nominal do produto químico em estudo**

19. Sempre que possível, deve calcular-se e registar-se a concentração nominal na câmara de exposição. Esta é dada pela divisão da massa gerada do produto químico em estudo pelo volume de ar total que circulou pela câmara. A concentração nominal não é utilizada para caracterizar a exposição dos animais, mas a sua comparação com a concentração real dá uma indicação da eficácia de geração do sistema de ensaio, podendo ser utilizada para detetar problemas a esse nível.

#### **Concentração real do produto químico em estudo**

20. Entende-se por "concentração real do produto químico em estudo", a concentração do produto químico na zona de respiração dos animais da câmara de inalação. As concentrações reais podem determinar-se por métodos específicos (por exemplo, amostragem direta ou métodos de adsorção ou de reação química e posterior caracterização analítica) ou por métodos inespecíficos, tais como gravimetria após filtração. O método gravimétrico só é aceitável para aerossóis de pós com um único componente ou de líquidos pouco voláteis e deve apoiar-se em caracterizações adequadas específicas do produto químico em causa efetuadas antes da realização do estudo. A concentração de aerossóis de pós com vários componentes também pode determinar-se por gravimetria. Todavia, são necessários para isso dados analíticos que demonstrem que a composição do produto transportado no aerossol é semelhante à do produto inicial. Se não se dispuser desses dados, pode ser necessário reanalisar periodicamente o produto químico em estudo (idealmente no aerossol) durante o ensaio. No caso dos agentes aerossolizados que possam evaporar-se ou sublimar, é necessário demonstrar que todas as fases são recolhidas pelo método escolhido. As concentrações visadas, nominais e reais devem figurar no relatório do estudo, mas apenas as concentrações reais são utilizadas na análise estatística para cálculo dos valores letais de concentração.
21. Deve utilizar-se, se possível, apenas um lote do produto químico em estudo e a amostra em estudo deve ser conservada em condições que preservem a sua pureza, homogeneidade e estabilidade. Antes de iniciar o estudo, deve caracterizar-se o produto químico em causa no que respeita à sua pureza e, se tecnicamente viável, à sua identidade e às quantidades dos contaminantes e impurezas nele identificados. Para o efeito, pode recorrer-se, entre outros, aos seguintes dados: tempos de retenção e áreas relativas de picos, pesos moleculares obtidos por espectrometria de massa ou cromatografia em fase gasosa ou outras estimativas. Embora a identidade da amostra a estudar não seja da responsabilidade do laboratório, pode ser aconselhável que este confirme, pelo menos, alguns aspetos da caracterização efetuada pelo cliente (cor, natureza física, etc.).
22. Deve manter-se a atmosfera de exposição tão constante quanto possível e proceder-se à sua monitorização continuamente e/ou intermitentemente, consoante o método de análise. Caso se proceda a uma colheita de amostras intermitente, num estudo de quatro horas deve recolher-se uma amostra da atmosfera da câmara pelo menos duas vezes. Se isso não for viável, por limitações relacionadas com o caudal de ar ou devido a concentrações baixas, pode colher-se uma amostra ao longo de todo o período de exposição. Se ocorrerem variações pronunciadas de uma amostra para outra, devem colher-se quatro amostras por exposição nas concentrações seguintes. A concentração na câmara correspondente a uma determinada amostra não deve desviar-se da concentração média na câmara mais de 10 %, no caso de gases e vapores, nem mais de 20 %, no caso de aerossóis de líquidos ou de sólidos. Deve calcular-se e registar-se o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio ( $t_{95}$ ). A duração da exposição corresponde ao tempo de geração do produto químico em estudo, incluído o tempo necessário para atingir  $t_{95}$ . O documento GD 39 (8) contém orientações para a estimativa do  $t_{95}$ .
23. No caso de misturas muito complexas de vapores ou gases e de aerossóis (por exemplo, atmosferas de combustão e produtos químicos gerados por produtos ou dispositivos finais específicos), o comportamento de cada fase na câmara de inalação pode ser diferente. Por esse motivo, deve escolher-se em cada fase (vapor ou gás e aerossol) pelo menos uma substância indicadora (substância analisada), normalmente a principal substância ativa da mistura. Se o produto químico em estudo for uma mistura, deve indicar-se no relatório a concentração analítica correspondente à mistura e não apenas a concentração correspondente ao ingrediente ativo ou ao componente (substância analisada) em causa. O documento GD 39 (8) contém mais informações sobre as concentrações reais.

### Distribuição granulométrica do produto químico em estudo

24. Deve determinar-se a distribuição granulométrica dos aerossóis pelo menos duas vezes durante cada exposição de quatro horas, recorrendo a um impactor de cascata ou a outro instrumento, tal como um granulómetro aerodinâmico. Se for possível demonstrar a equivalência dos resultados obtidos pelo impactor de cascata e pelo instrumento alternativo, pode utilizar-se este último em todo o estudo. Em paralelo ao instrumento primário, deve utilizar-se um segundo dispositivo, tal como um filtro gravimétrico ou um borbulhador de gás/impactor *impinger*, para confirmar a eficiência de captação do primeiro. As concentrações mássicas obtidas por análise granulométrica e por análise com filtros não devem diferir entre si mais do que valores razoáveis [ver o GD 39 (8)]. Se for possível demonstrar esta equivalência no início do estudo, não é necessário efetuar mais medições de confirmação. Por razões de bem-estar animal, devem tomar-se medidas para minimizar dados inconclusivos que possam obrigar à repetição de exposições. É necessário efetuar uma análise granulométrica no caso dos vapores que possam condensar-se para formar aerossóis ou se forem detetadas partículas numa atmosfera de vapores suscetível de formar fases mistas (ver o ponto 14).

### PROCEDIMENTO

#### Ensaio principal

25. Utiliza-se em cada etapa três animais de cada sexo ou seis animais do sexo mais sensível. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Para dose inicial, escolhe-se, das quatro concentrações fixas, a que tenha mais probabilidade de produzir efeitos tóxicos em alguns dos animais expostos. Os esquemas de ensaio para gases, vapores e aerossóis constantes dos apêndices 2 a 4 representam o procedimento a seguir em função dos valores-limite das categorias de classificação, rotulagem e embalagem 1 a 4 estabelecidos (9) para gases (100, 500, 2 500, 20 000 ppm durante 4 h, apêndice 2), vapores (0,5, 2, 10, 20 mg/l durante 4 h, apêndice 3) e aerossóis (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l durante 4 h, apêndice 4). A categoria 5, que o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (9) não prevê, aplica-se às concentrações acima do limite correspondente. A cada concentração inicial aplica-se o esquema de ensaio respetivo. O procedimento de ensaio consiste em seguir no fluxograma as setas correspondentes ao número de animais eutanasiados ou que morreram, até ser possível atribuir uma categoria.
26. O intervalo de tempo entre a exposição dos diversos grupos é determinado pelo aparecimento, pela duração e pela intensidade dos sinais de toxicidade observados. Não se expõem animais ao nível de concentração seguinte enquanto não houver um grau razoável de confiança na sobrevivência dos últimos animais expostos. Recomenda-se um período de três ou quatro dias entre a exposição a cada nível de concentração, de modo a permitir a observação de efeitos tóxicos retardados. Se necessário, o intervalo de tempo pode ser ajustado, por exemplo, em caso de respostas inconclusivas.

#### Ensaio do limite

27. Efetua-se este ensaio caso se saiba ou preveja que o produto químico em estudo é praticamente não tóxico, isto é, só induzirá toxicidade acima da concentração-limite prevista na regulamentação aplicável. Podem obter-se informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo a partir de ensaios já realizados com substâncias ou misturas semelhantes, tomando em consideração a identidade e percentagem dos componentes de importância toxicológica reconhecida. Nos casos em que se disponha de pouca ou nenhuma informação sobre a toxicidade do produto químico em estudo ou quando este for previsivelmente tóxico, deve efetuar-se o estudo principal — o documento GD 39 (8) contém mais orientações.
28. Seguindo o procedimento normal, constitui ensaio do limite neste método de ensaio expor três animais de cada sexo, ou seis animais do sexo mais sensível, às concentrações de 20 000 ppm (gases), 20 mg/l (vapores) e 5 mg/l (poeiras e nebulizados), se for possível atingi-las. Ao ensaiar aerossóis, o principal objetivo é conseguir obter partículas de dimensões respiráveis (MMAD compreendido entre 1 µm e 4 µm), o que, com a maior parte dos produtos químicos, se consegue a uma concentração de 2 mg/l. Só deve tentar-se ensaiar aerossóis a concentrações superiores a 2 mg/l se for possível gerar partículas de dimensões respiráveis [ver o GD 39 (8)]. Por razões de bem-estar animal, o sistema GHS (16) desaconselha o ensaio de concentrações superiores à concentração-limite. Só importa ponderar a realização de ensaios relativos à categoria 5 do sistema GHS (16), não prevista no Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (9), se for elevada a probabilidade de os resultados desses ensaios terem interesse direto para a proteção da saúde humana, o que deve justificar-se no relatório do estudo. No caso de produtos químicos potencialmente explosivos, deve tomar-se precauções para evitar condições favoráveis à ocorrência de explosões. Para evitar a utilização desnecessária de animais, deve efetuar-se um ensaio sem animais antes do ensaio do limite, para verificar se é possível atingir as condições deste ensaio nas câmaras.

### EXAMES

29. Os animais devem ser examinados clinicamente com frequência durante o período de exposição. Depois desta, deve efetuar-se um exame clínico pelo menos duas vezes no dia da exposição — ou mais vezes, quando a resposta dos animais à exposição o aconselhar — e pelo menos uma vez por dia em seguida, durante 14 dias. Não é fixada uma duração do período de observação, que deve depender da natureza e do momento do aparecimento de sinais clínicos, assim como da duração do período de recuperação. O momento do aparecimento e do desaparecimento dos sinais de toxicidade é importante, nomeadamente se houver uma certa demora na manifestação desses sinais. Todas as observações devem ser sistematicamente registadas, mantendo registos individuais para cada animal. Os animais moribundos ou que apresentem sinais de dor intensa e/ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados, por razões de bem-estar animal. No exame clínico de sinais de toxicidade, não devem confundir-se um mau aspeto inicial e alterações respiratórias passageiras, imputáveis ao

procedimento de exposição, com efeitos decorrentes da exposição propriamente dita. Devem ser tidos em conta os princípios e critérios resumidos no documento de orientações relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (7). Se forem eutanasiados animais ou forem encontrados animais mortos, deve registar-se o momento da morte com a maior exatidão possível.

30. Os exames a efetuar aos animais engaiolados devem incidir, nomeadamente, nas alterações da pele e da pelagem, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do sistema circulatório, dos sistemas nervosos autónomo e central, da atividade somatomotora e do comportamento. Se possível, registar as diferenças eventualmente observadas entre efeitos locais e sistémicos. Deve estar-se atento a tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. A medição da temperatura retal pode corroborar uma bradipneia reflexa ou uma hipo/hipertermia relacionadas com a exposição ou com o confinamento.

#### **Peso corporal**

31. Regista-se o peso de cada animal uma vez durante o período de aclimação, no dia da exposição, antes desta (dia 0), e, pelo menos, nos dias 1, 3 e 7 (e posteriormente uma vez por semana), bem como no momento da morte ou da eutanásia, se posterior ao dia 1. O peso corporal é reconhecidamente um indicador crítico de toxicidade, pelo que é necessário observar atentamente os animais cujo peso decresça 20 % ou mais relativamente ao peso anterior ao estudo e não volte a aumentar. No final do período após a exposição, pesa-se e eutanasia-se os animais sobreviventes.

#### **Patologia**

32. Os animais utilizados nos ensaios (incluindo os que morrerem durante o ensaio ou que forem eutanasiados e retirados do estudo por razões de bem-estar animal) devem ser sujeitos a uma autópsia macroscópica. Se não for possível realizar a autópsia imediatamente depois de detetada a morte do animal, este deve ser refrigerado (não congelado) a uma temperatura suficientemente baixa para minimizar a autólise. As autópsias devem ser efetuadas o mais rapidamente possível, normalmente não mais de um ou dois dias após a morte. Regista-se todas as alterações patológicas macroscópicas de cada animal, prestando especial atenção às alterações do aparelho respiratório.
33. Pode efetuar-se outros exames previamente previstos para alargar o valor interpretativo do estudo, tais como a pesagem dos pulmões dos ratos sobreviventes e/ou a pesquisa, por exame microscópico, de irritações do aparelho respiratório. Também podem examinar-se os órgãos que evidenciem macropatologias de animais que tenham sobrevivido 24 horas ou mais, bem como órgãos que se saiba serem afetados ou que se preveja serem-no. O exame microscópico de todo o aparelho respiratório pode fornecer elementos úteis no caso dos produtos químicos que reagem com a água, tais como os ácidos e os produtos químicos higroscópicos.

#### **DADOS E RELATÓRIOS**

##### **Dados**

34. Devem ser indicados o peso corporal e os resultados da autópsia de cada animal. Deve resumir-se os resultados dos exames clínicos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentaram sinais específicos de toxicidade, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados e o momento da morte de cada animal, complementados por uma descrição dos efeitos tóxicos e da evolução e reversibilidade destes, bem como pelos resultados das autópsias.

##### **Relatório dos ensaios**

35. Elementos a constar, quando pertinente, do relatório dos ensaios:

###### *Animais estudados e condições em que são mantidos*

- descrição das condições de engaiolamento, nomeadamente: número (ou alteração do número) de animais por gaiola, camas, temperatura e humidade relativa ambientes, fotoperíodo e dieta,
- espécie e estirpe utilizadas e, caso não sejam utilizados ratos, justificação da utilização de outra espécie,
- número, idade e sexo,
- método de aleatorização,
- elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),
- descrição de eventuais condicionamentos anteriores ao ensaio, nomeadamente ao nível da dieta, de quarentenas e do tratamento de doenças.

*Produto químico em estudo*

- natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas pertinentes (incluindo a isomerização),
- dados de identificação e, se for conhecido, número de registo CAS (*Chemical Abstract Service*).

*Veículo*

- justificação da utilização e da escolha do veículo (se não for água),
- dados históricos ou paralelos demonstrativos de que o veículo não interfere nos resultados do estudo.

*Câmaras de inalação*

- descrição – incluindo dimensões e volume – das câmaras de inalação,
- origem e descrição do equipamento utilizado na exposição dos animais e na geração da atmosfera,
- equipamento de medição da temperatura, humidade, granulometria e concentração real,
- fonte de ar, tratamento do ar fornecido/evacuado e sistema de climatização utilizado,
- métodos utilizados para calibrar o equipamento a fim de garantir a homogeneidade da atmosfera ensaiada,
- subpressão ou sobrepressão,
- pontos de exposição por câmara (de exposição unicamente nasal); localização dos animais no sistema (câmara de exposição de corpo inteiro),
- homogeneidade/estabilidade no tempo da atmosfera ensaiada,
- localização nas câmaras dos sensores térmicos e higrométricos e dos pontos de colheita de amostras da atmosfera ensaiada,
- caudais de ar, caudal de ar em cada ponto de exposição (exposição unicamente nasal) ou relação entre o volume ocupado pelos animais e o volume da câmara (câmara de exposição de corpo inteiro),
- informações sobre o equipamento eventualmente utilizado para medir o oxigénio e o dióxido de carbono,
- tempo necessário para as câmaras de inalação atingirem o equilíbrio ( $t_{95}$ ),
- número horário de substituições de volume,
- medidores (se existirem).

*Elementos relativos à exposição*

- fundamentação da escolha da concentração visada no estudo principal,
- concentrações nominais (dadas pela divisão da massa do produto químico em estudo introduzido na câmara de inalação pelo volume de ar total que nela circulou),
- concentrações reais do produto químico em estudo obtidas na zona de respiração dos animais; no caso das misturas estudadas que geram formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerossóis), pode analisar-se separadamente cada uma delas,
- as concentrações no ar devem indicar-se em unidades de massa (mg/l, mg/m<sup>3</sup>, etc.); podem igualmente indicar-se unidades de volume (ppm, ppb, etc.) entre parêntesis,
- distribuição granulométrica, diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) e desvio-padrão geométrico ( $\sigma_g$ ), incluindo os métodos de cálculo correspondentes; indicar também o resultado de cada análise granulométrica efetuada.



*Condições de realização dos ensaios*

- elementos sobre a preparação do produto químico estudado, nomeadamente sobre eventuais métodos de redução da granulometria de sólidos ou de preparação de soluções do produto químico. Se o recurso a processos mecânicos for passível de ter alterado a composição do produto químico em estudo, incluir os resultados das análises efetuadas para verificar a composição deste,
- descrição (de preferência complementada por um esquema) do equipamento utilizado para gerar a atmosfera ensaiada e para expor os animais a essa atmosfera,
- elementos sobre o método de análise química utilizado e sobre a validação desse método (incluindo o rendimento da recuperação do produto químico em estudo do meio amostrado),
- Fundamentação da escolha das concentrações utilizadas nos ensaios.

*Resultados*

- quadro com a temperatura, a humidade e o caudal de ar nas câmaras,
- quadro com as concentrações nominais e reais nas câmaras,
- quadro com os dados granulométricos, nomeadamente dados analíticos sobre a colheita de amostras, a distribuição granulométrica e os cálculos de MMAD e  $\sigma_g$ ,
- quadro com os dados de resposta e as concentrações correspondentes a cada animal (animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, e natureza, intensidade e duração dos efeitos),
- pesos corporais de cada animal registados durante os dias do estudo, bem como a data e o momento da morte, se anterior à eutanásia programada; aparecimento, evolução e eventual reversibilidade de sinais de toxicidade em cada animal,
- resultados da autópsia e resultados histopatológicos correspondentes a cada animal, se disponíveis,
- categoria no sistema de classificação, embalagem e rotulagem e valor-limite da CL<sub>50</sub>.

*Discussão e interpretação dos resultados*

- deve ser dada especial atenção à descrição dos métodos utilizados para satisfazer os critérios deste método de ensaio, nomeadamente no que respeita à concentração-limite e à granulometria,
- examinar em que medida, com base nos resultados globais, as partículas são respiráveis, em especial se os critérios granulométricos não forem satisfeitos,
- a apreciação global do estudo deve incidir igualmente na coerência dos métodos utilizados para determinar as concentrações nominal e real e deve dar conta da relação entre estas concentrações,
- referir a causa provável da morte e o modo de ação predominante (sistémico ou local),
- explicar por que razão terá sido necessário eutanasiar animais que apresentavam sinais de dor ou de grande sofrimento continuado, com base nos critérios do documento de orientações da OCDE relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (7).

**REFERÊNCIAS:**

- 1) Capítulo B.2 deste anexo, "Toxicidade aguda (inalação)".
- 2) Holzhütter H.-G., Genschow E., Diener W., Schlede E. (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77:243-254.
- 3) Diener W., Kayser D., Schlede E. (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71:537-549.

- 4) Diener W., Schlede E. (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC<sub>50</sub> Tests. *ALTEX* 1:129-134.
  - 5) Capítulo B.1.tris deste anexo, "Toxicidade oral aguda – Método de classificação de toxicidade aguda".
  - 6) OCDE (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105. OCDE, Paris. Disponível em <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
  - 7) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Disponível em <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
  - 8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39. OCDE, Paris. Disponível em <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
  - 9) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).
  - 10) Capítulo B.40 deste anexo, "Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio da resistência elétrica transcutânea (RET)".
  - 11) Capítulo B.40.A deste anexo, "Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio em modelos de pele humana".
  - 12) OCDE (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OCDE Guideline for testing of chemicals No. 435. OCDE, Paris. Disponível em <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
  - 13) Phalen R.F. (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques (2.ª edição). Informa Healthcare, New York.
  - 14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18:321-327.
  - 15) Pauluhn J., Thiel A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27:160-167.
  - 16) ONU (2007). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30, ONU, Nova Iorque e Genebra. Disponível em [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_welcome\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html).
-

*Apêndice 1*

## DEFINIÇÃO

**Produto químico em estudo:** qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

---

*Apêndice 2***Procedimento a seguir para gases em função da concentração (ppm) INICIAL (4 h)**Observações gerais <sup>(1)</sup>

Esquematiza-se neste apêndice o procedimento de ensaio a seguir consoante a concentração inicial.

Apêndice 2a: concentração inicial de 100 ppm;

Apêndice 2b: concentração inicial de 500 ppm;

Apêndice 2c: concentração inicial de 2 500 ppm;

Apêndice 2d: concentração inicial de 20 000 ppm.

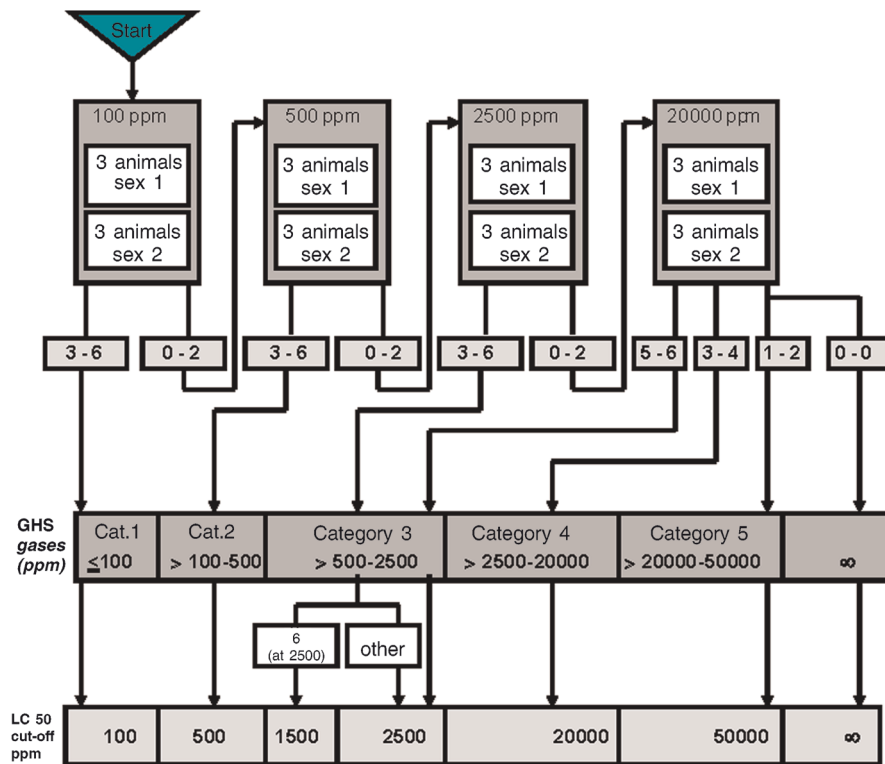
O procedimento de ensaio segue as setas correspondentes ao número de animais eutanasiados ou que morreram.

---

<sup>(1)</sup> Os quadros seguintes reportam-se ao sistema GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos). O equivalente na União Europeia é o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (9), que não prevê a categoria 5 para a toxicidade aguda por inalação.

Apêndice 2a

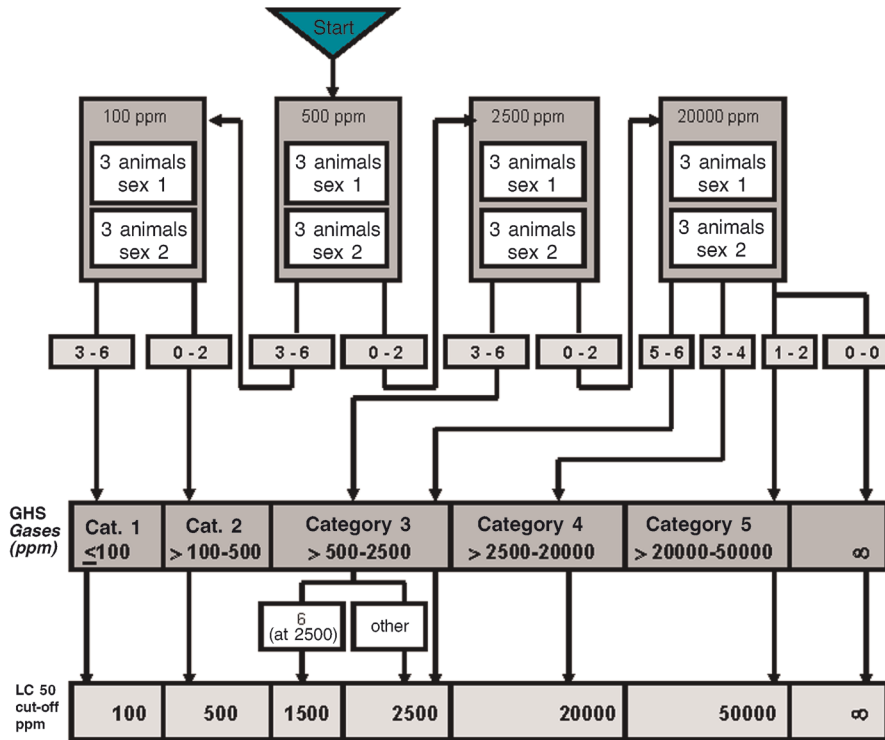
**Acute Inhalation Toxicity:**  
**Test Procedure with a starting concentration of 100 ppm/4 h for gases**



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

Apêndice 2b

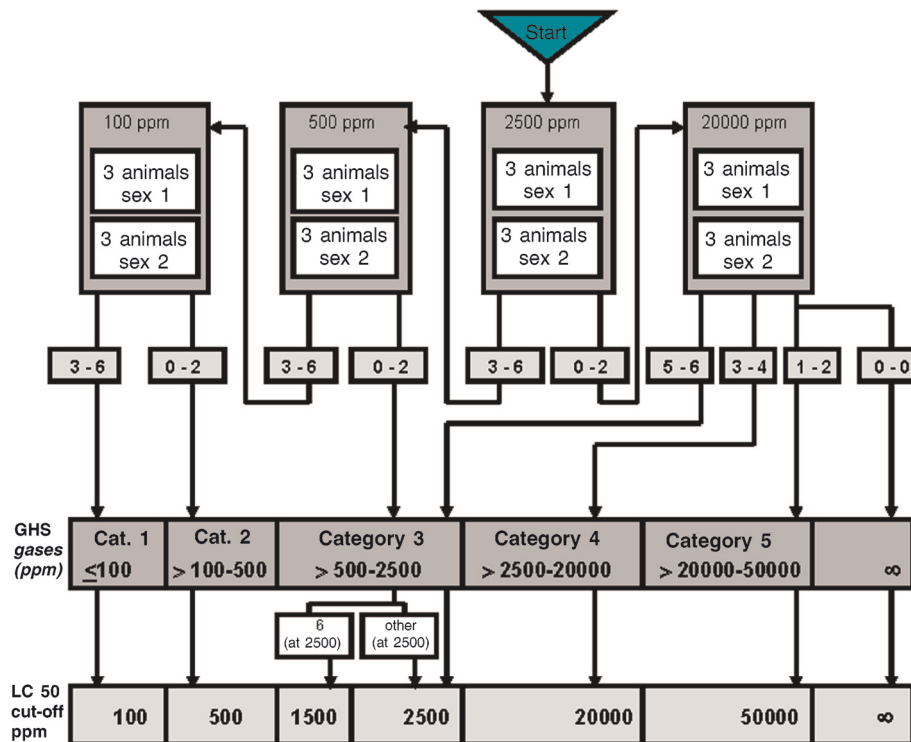
**Acute Inhalation Toxicity:  
Test Procedure with a starting concentration of 500 ppm/4h for gases**



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

Apêndice 2c

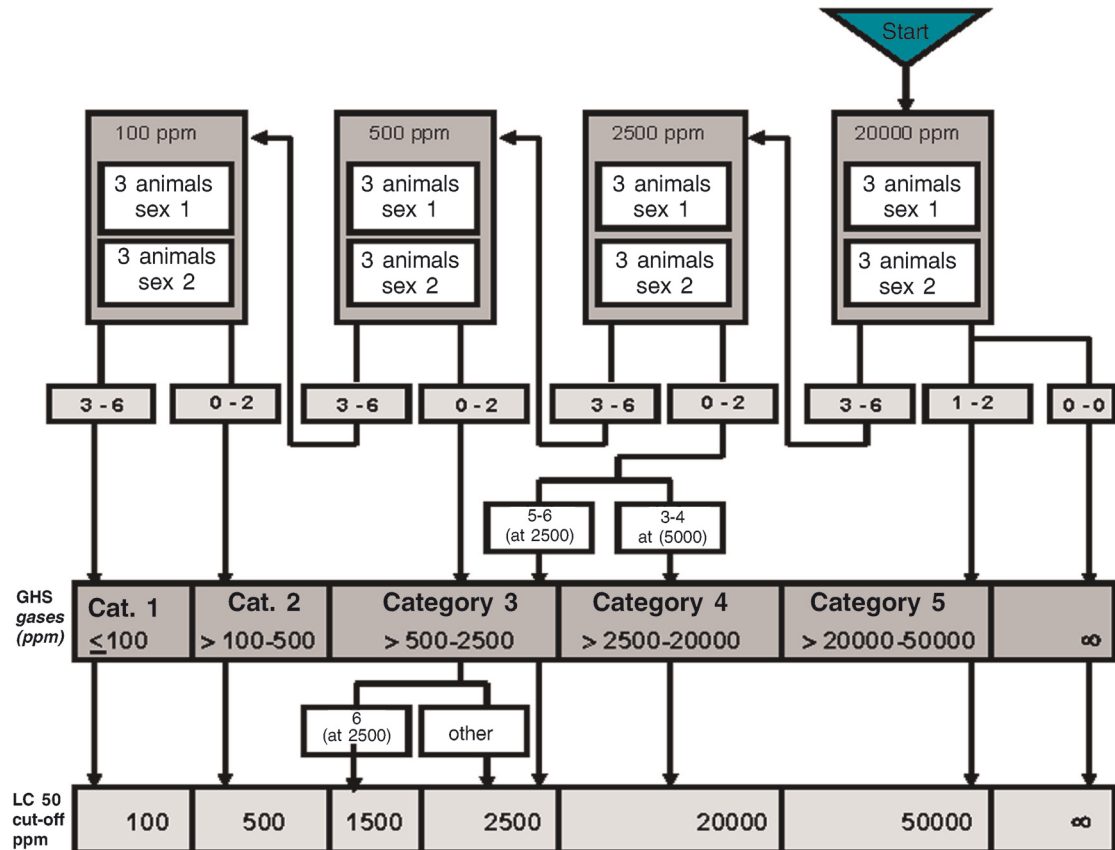
**Acute Inhalation Toxicity:  
Test Procedure with a starting concentration of 2 500 ppm/4h for gases**



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

## Apêndice 2d

**Acute Inhalation Toxicity:**  
**Test Procedure with a starting concentration of 20 000 ppm/4h for gases**



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at ≥ 20 000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)



*Apêndice 3***Procedimento a seguir para vapores em função da concentração (mg/l) inicial (4 h)**Observações gerais <sup>(1)</sup>

Esquematiza-se neste apêndice o procedimento de ensaio a seguir consoante a concentração inicial.

Apêndice 3a: concentração inicial de 0,5 mg/l;

Apêndice 3b: concentração inicial de 2,0 mg/l;

Apêndice 3c: concentração inicial de 10 mg/l;

Apêndice 3d: concentração inicial de 20 mg/l.

O procedimento de ensaio segue as setas correspondentes ao número de animais eutanasiados ou que morreram.

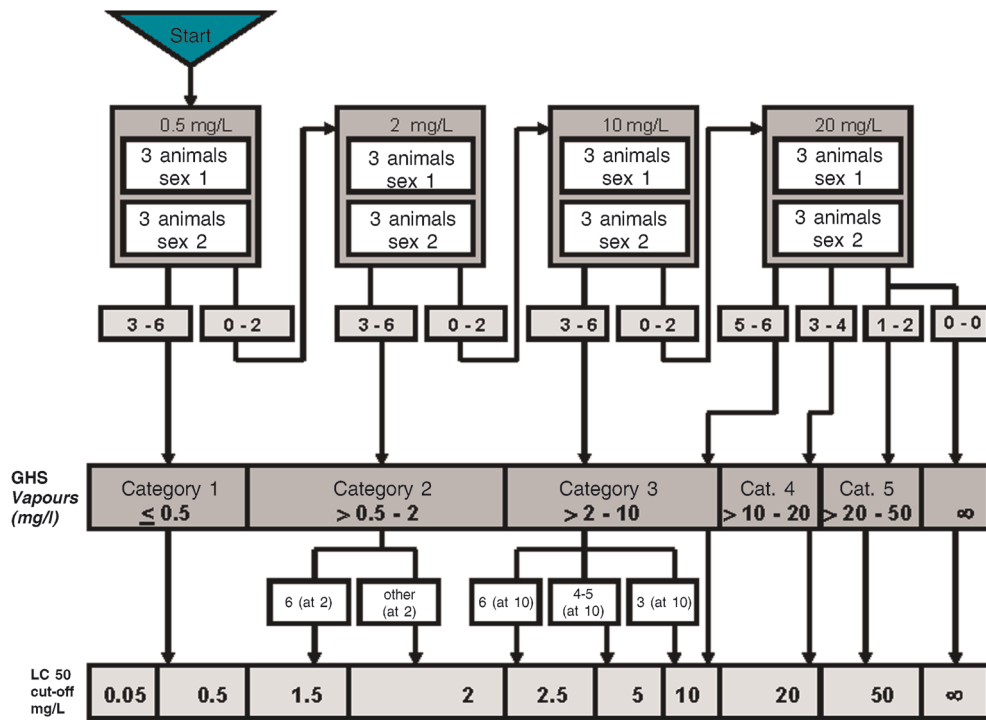
---

<sup>(1)</sup> Os quadros seguintes reportam-se ao sistema GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos). O equivalente na União Europeia é o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (9), que não prevê a categoria 5 para a toxicidade aguda por inalação.

Apêndice 3a

Acute Inhalation Toxicity:

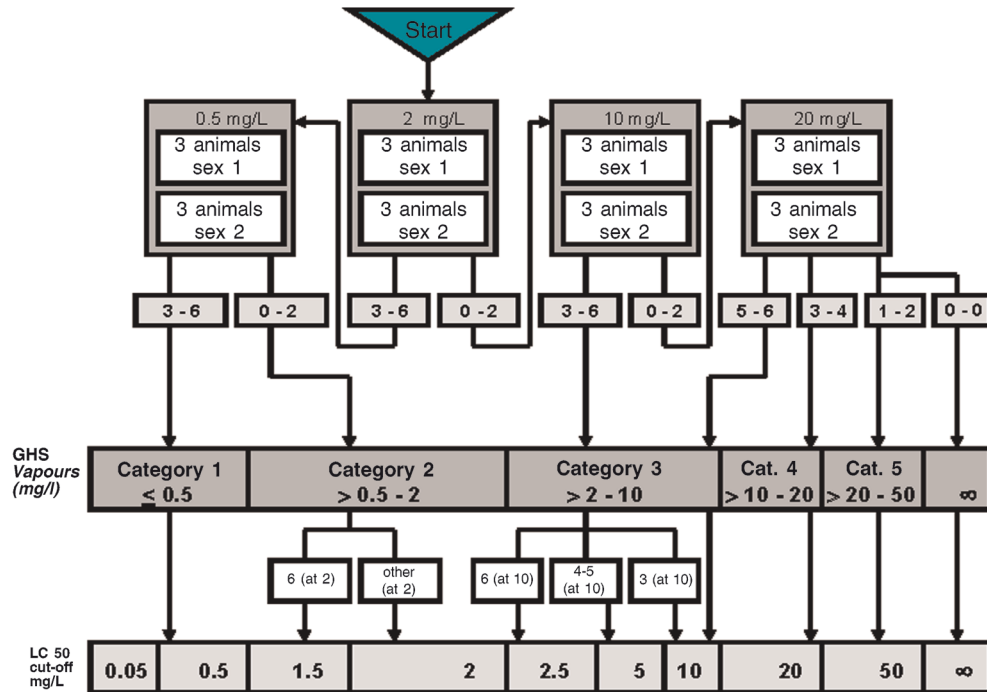
Test procedure with a starting concentration of 0,5 mg/L/4h for vapours



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

## Apêndice 3b

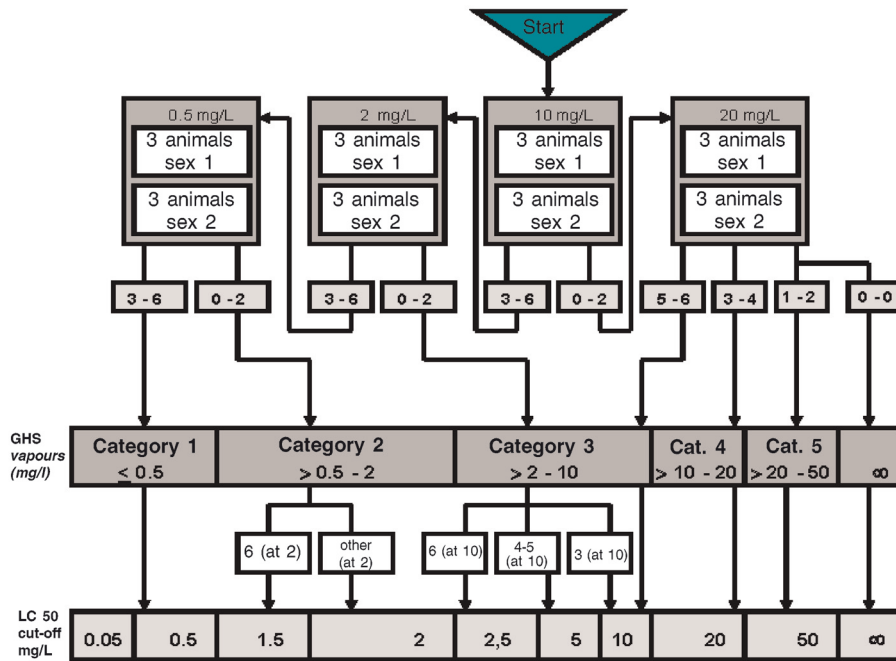
**Acute Inhalation Toxicity:**  
**Test procedure with a starting concentration of 2 mg/L/4h for vapours**



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

Apêndice 3c

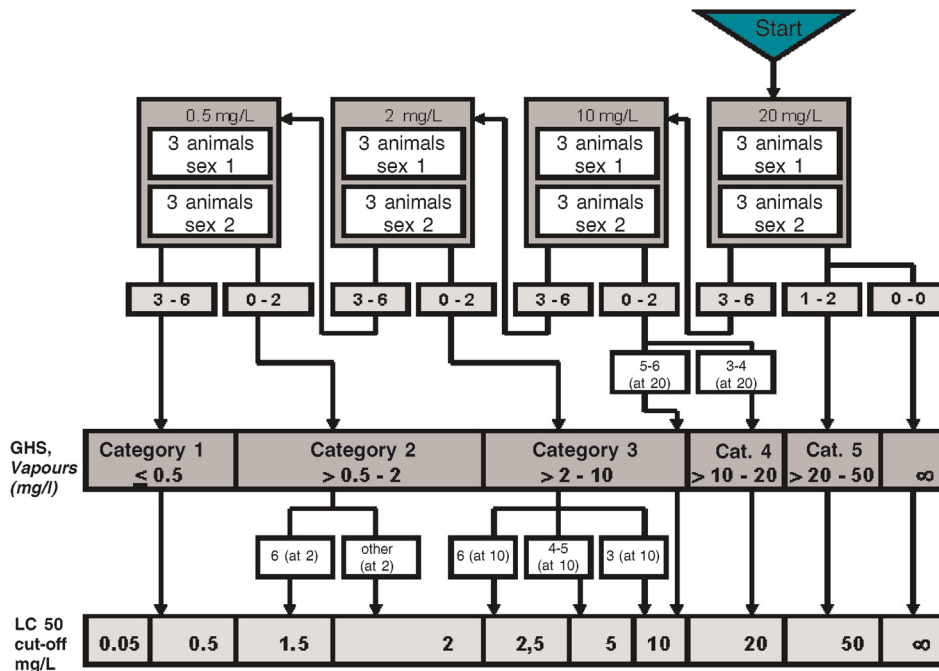
**Acute Inhalation Toxicity:**  
**Test procedure with a starting concentration of 10 mg/L/4h for vapours**



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used pers step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

Apêndice 3d

**Acute Inhalation Toxicity:**  
**Test procedure with a starting concentration of 20 mg/L/4h for vapours**



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39(8)

*Apêndice 4***procedimento a seguir para aerossóis em função da concentração (mg/l) inicial (4 h)**Observações gerais <sup>(1)</sup>

Esquematiza-se neste apêndice o procedimento de ensaio a seguir consoante a concentração inicial.

Apêndice 4a: concentração inicial de 0,05 mg/l;

Apêndice 4b: concentração inicial de 0,5 mg/l;

Apêndice 4c: concentração inicial de 1 mg/l;

Apêndice 4d: concentração inicial de 5 mg/l.

O procedimento de ensaio segue as setas correspondentes ao número de animais eutanasiados ou que morreram.

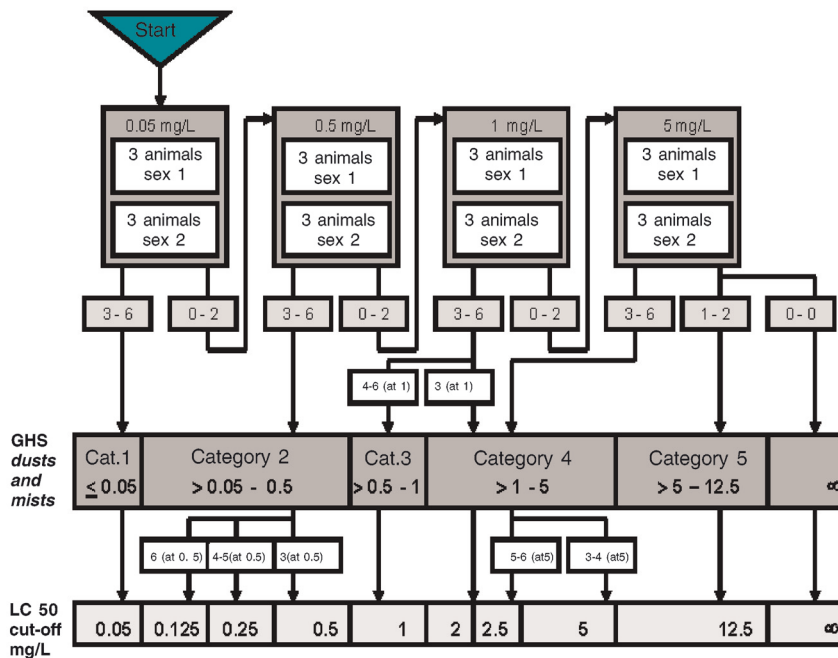
---

<sup>(1)</sup> Os quadros seguintes reportam-se ao sistema GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos). O equivalente na União Europeia é o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (9), que não prevê a categoria 5 para a toxicidade aguda por inalação.

Apêndice 4a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,05 mg/L/4h for vapours

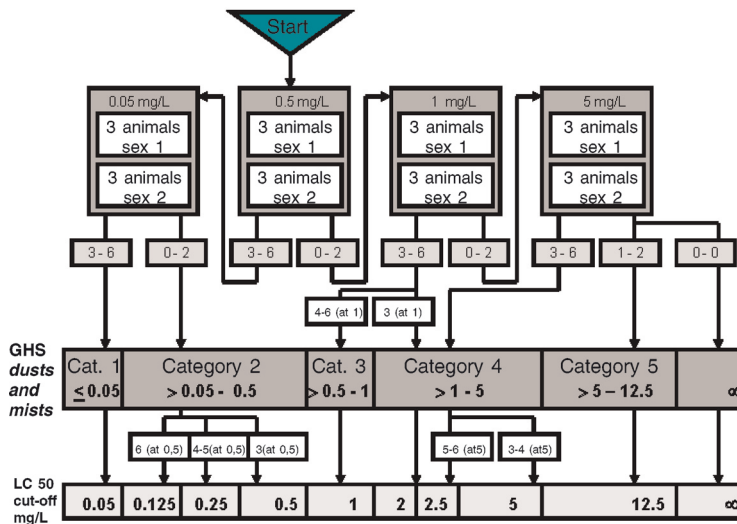


- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

Apêndice 4b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,5 mg/L/4h for aerosols



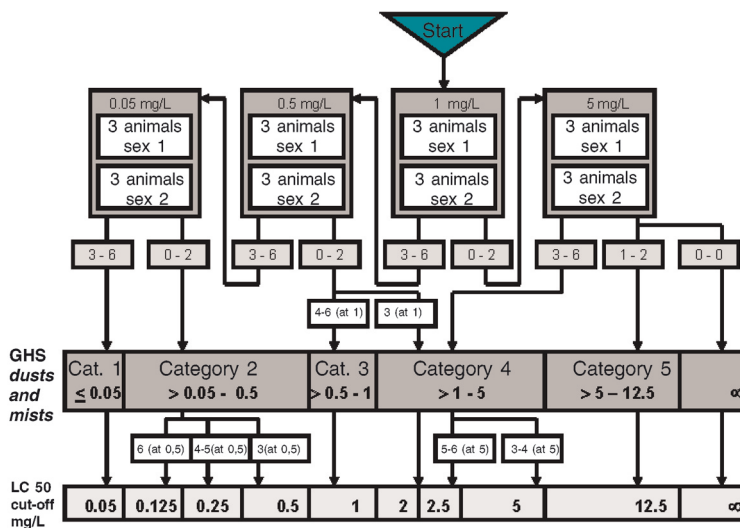
- 3  $\sigma$  + 3  $\varphi$ , or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- $\infty$ : unclassified
- Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)



Apêndice 4c

Acute inhalation toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 1 mg/L/4h for aerosols

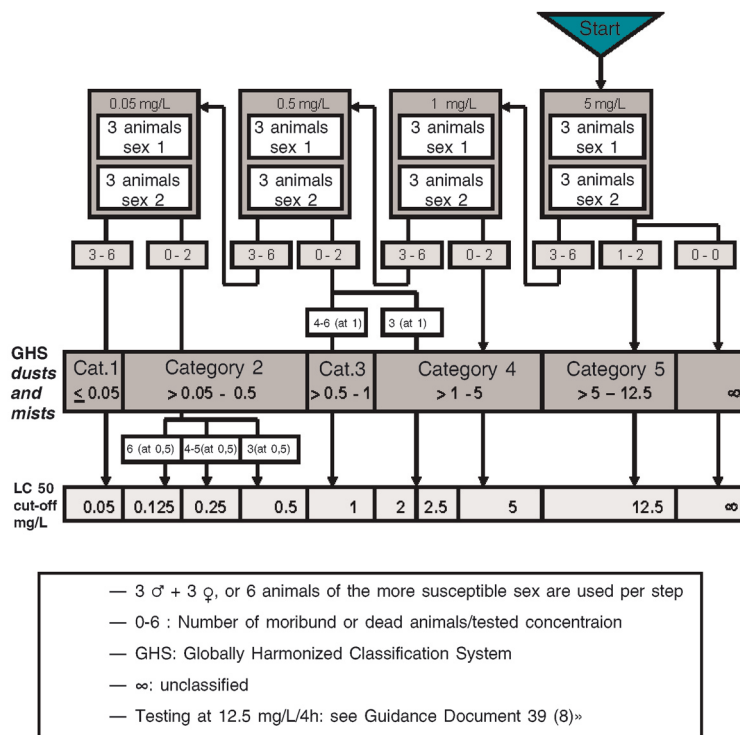


- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

## Apêndice 4d

## Acute Inhalation Toxicity:

## Test procedure with a starting concentration of 5 mg/L/4h for aerosols



9) O capítulo C.10 passa a ter a seguinte redação:

«C.10. ENSAIO DE SIMULAÇÃO DO TRATAMENTO AERÓBIO DE EFLUENTES C.10-A: UNIDADES DE LAMAS ATIVADAS — C.10-B BIOFILMES

**C.10-A: Unidades de lamas ativadas**

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 303 da OCDE (2001). Na década de 1950, concluiu-se que os novos tensoativos causavam a formação excessiva de espuma nas estações de tratamento de águas residuais e nos cursos de água. Observou-se que não eram totalmente eliminados no tratamento aeróbio e que, em alguns casos, limitavam a remoção de outras matérias orgânicas. Este facto levou à realização de várias investigações sobre o modo como os tensoativos poderiam ser removidos das águas residuais e a compatibilidade dos novos produtos químicos produzidos pela indústria com o tratamento de águas residuais. Para este efeito, foram utilizados modelos de unidades que representavam os dois principais tipos de tratamento biológico aeróbio das águas residuais (lamas ativadas e filtração por percolação ou em leito percolador). Seria inviável e muito oneroso disseminar cada novo produto químico e monitorizar estações de tratamento em grande escala, mesmo a nível local.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

**Unidades de lamas ativadas**

2. Estão descritos modelos de unidades de lamas ativadas de volume compreendido entre 300 ml e 2 000 ml. Alguns modelos, que constituem réplicas bastante fiéis de estações à escala real, possuem tanques de decantação a partir dos quais as lamas decantadas são bombeadas para um tanque de arejamento, enquanto outros, como o modelo Swisher (1), não possuem decantadores. As dimensões a adotar resultam de um compromisso; por um lado, devem ser suficientemente grandes para que as operações mecânicas sejam executadas de forma correta e para que o volume das amostras seja suficiente, sem afetar o funcionamento; por outro, o equipamento não deve ocupar demasiado espaço nem exigir uma quantidade excessiva de materiais.

3. As unidades de Husmann (2) e as unidades de vasos porosos (3)(4) constituem dois tipos de dispositivos utilizados em larga escala e de forma satisfatória, tendo sido os primeiros utilizados no estudo dos tensioativos; estas unidades são descritas no presente método de ensaio. Foram também utilizadas com resultados satisfatórios outras unidades, como, por exemplo, a de Eckenfelder (5). Atendendo ao custo relativamente elevado e ao esforço apreciável que o recurso ao presente ensaio de simulação implica, foram estudados em paralelo ensaios de rastreio mais simples e menos onerosos, que constam do capítulo C.4 A-F do presente anexo (6). A experiência adquirida com muitos tensioativos e outros produtos químicos demonstrou que aqueles que são aprovados nos ensaios de rastreio (facilmente biodegradáveis) se degradaram também no ensaio de simulação. Alguns produtos químicos que não foram aprovados nos ensaios de rastreio foram-no nos ensaios de biodegradabilidade inerente — capítulos C.12 (7) e C.19 (8), do presente anexo —, mas apenas alguns destes últimos se degradaram no ensaio de simulação; os produtos químicos não aprovados nos ensaios de biodegradabilidade inerente não se degradaram nos ensaios de simulação (9)(10)(11).
4. Para alguns fins, são suficientes os ensaios de simulação efetuados com uma única combinação condições experimentais; os resultados são expressos em percentagem de remoção do produto químico em estudo ou do carbono orgânico dissolvido (COD). O presente método apresenta uma descrição de um desses ensaios. No entanto, contrariamente à versão anterior deste capítulo, que descrevia apenas um tipo de dispositivo para o tratamento de águas residuais sintéticas em unidades interligadas, utilizando um método relativamente rudimentar de rejeição das lamas, o presente texto contempla diversas variantes. Descreve-se alternativas para o tipo de dispositivo, o modo de funcionamento, as águas residuais e a rejeição das lamas. O texto segue de perto a norma ISO 11733 (12), que foi objeto de análise cuidadosa durante a preparação deste método; porém, este não foi ainda sujeito a um ensaio interlaboratorial.
5. Para outros fins, é necessário conhecer de forma mais precisa a concentração do produto químico em estudo no efluente, o que implica o recurso a um método mais elaborado. O caudal da rejeição de lamas, por exemplo, deve ser controlado de forma mais precisa ao logo de cada dia e do período do ensaio, sendo necessário que as unidades funcionem com vários caudais de rejeição. No caso de um método mais elaborado, devem também ser realizados ensaios a duas ou três temperaturas diferentes: Birch (13)(14) descreve um método desse tipo, que se resume no apêndice 6. Contudo, os conhecimentos atuais são insuficientes para decidir quais os modelos cinéticos aplicáveis à biodegradação de produtos químicos no tratamento de águas residuais e no meio aquático em geral. A aplicação da cinética de Monod, que se refere no apêndice 6 a título de exemplo, limita-se a produtos químicos presentes em quantidades não inferiores 1 mg/l, embora, de acordo com algumas fontes, isto tenha ainda de ser demonstrado. O apêndice 7 diz respeito a ensaios a concentrações mais próximas das observadas nas águas residuais; contudo, esses ensaios, assim como os que constam do apêndice 6, não constituem, por si só, métodos diferenciados.

#### Filtros

6. Tem sido dada uma menor atenção aos modelos com filtros de percolação, provavelmente por ocuparem mais espaço e serem menos compactos do que os modelos de estações de lamas ativadas. Gerike *et al.* desenvolveram unidades de filtração em leito percolador e utilizaram-nas interligadas (15). Os filtros utilizados são relativamente grandes (altura 2 m; volume 60 l) e cada um deles necessita de um caudal de águas residuais da ordem de 2 l/h. Baumann *et al.* (16) simularam filtros de leito percolador inserindo fitas de poliéster "aveludado" em tubos de 1 m (14 mm de diâmetro interno) previamente imersas durante 30 minutos em lamas ativadas concentradas. O produto químico em estudo, única fonte de carbono numa solução de sais minerais, foi descarregado no tubo vertical e avaliou-se a biodegradação através de medições de COD no efluente e de CO<sub>2</sub> no gás libertado.
7. Foram simulados ainda biofiltros de outra forma (15): as superfícies internas de tubos rotativos, com uma inclinação ligeira em relação à horizontal, foram alimentadas com águas residuais (cerca de 250 ml/h) com e sem o produto químico em estudo, tendo os efluentes recolhidos sido analisados para a determinação do COD e/ou daquele produto.

#### PRINCÍPIO DO MÉTODO

8. Este método destina-se a determinar a eliminação e a biodegradação primária e/ou final, por microrganismos aeróbios, de produtos químicos orgânicos hidrossolúveis, num sistema de ensaio em funcionamento contínuo que simula o processo das lamas ativadas. As fontes de carbono e de energia dos microrganismos são um meio orgânico facilmente biodegradável e o produto químico em estudo.
9. Duas unidades de ensaio em funcionamento contínuo (sistema de lamas ativadas ou de vasos porosos) funcionam em paralelo e em condições idênticas, selecionadas de acordo com o objetivo do ensaio. Normalmente, o tempo médio de retenção hidráulica é de 6 h e o tempo de permanência médio (tempo de retenção) das lamas é de 6 a 10 dias. A rejeição das lamas processa-se por um de dois métodos: o produto químico em estudo é geralmente adicionado ao afluente (meio orgânico) de apenas uma das unidades numa concentração compreendida entre 10 mg/l e 20 mg/l de carbono orgânico dissolvido (COD). A segunda unidade é utilizada como unidade de controlo para determinar a biodegradação do meio orgânico.
10. Determina-se o COD (de preferência), ou a carência química de oxigénio (CQO), juntamente com a concentração do produto químico em estudo (se necessário), por meio de análises específicas efetuadas a amostras, colhidas com frequência, do efluente da unidade que recebe o produto químico em estudo. Presume-se que a diferença entre as concentrações de COD ou de CQO no efluente das unidades de ensaio e de controlo, é devida ao produto químico em estudo ou aos seus metabolitos orgânicos. Essa diferença é comparada com a concentração de COD ou CQO no afluente ao produto químico em estudo, a fim de determinar a eliminação deste.

11. A biodegradação pode geralmente distinguir-se da bioadsorção através de um exame cuidadoso da curva de eliminação em função do tempo, podendo confirmar-se através de um ensaio de biodegradabilidade "fácil", por recurso a um inóculo aclimatado da unidade recetora do produto químico em estudo.

#### INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

12. A pureza, a hidrossolubilidade, a volatilidade e as características de adsorção do produto químico em estudo devem ser conhecidas, a fim de permitir uma interpretação correta dos resultados. Em geral, os produtos químicos voláteis e os produtos químicos insolúveis não podem ser alvo de ensaio, salvo se forem tomadas precauções especiais (ver o apêndice 5). A estrutura química ou, pelo menos, a fórmula empírica, devem também ser conhecidas para o cálculo dos valores teóricos e/ou a confirmação dos valores medidos de parâmetros como, por exemplo, a carência teórica de oxigénio (CTeO), o carbono orgânico dissolvido (COD) e a carência química de oxigénio (CQO).
13. O facto de se dispor de informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo para os microrganismos (apêndice 4) pode ser útil para seleccionar concentrações de ensaio adequadas e essencial para uma interpretação correta dos valores baixos de biodegradação que possam surgir.

#### NÍVEIS DE APROVAÇÃO

14. Na aplicação inicial do presente ensaio de simulação (confirmação) da biodegradação primária de tensoativos, era necessário que mais de 80 % do produto químico em causa fosse removido antes de o tensoativo poder ser comercializado. Se a referida percentagem não for atingida, pode recorrer-se ao presente ensaio de simulação (confirmação) e o tensoativo só pode ser comercializado se mais de 90 % do produto químico causa for removido. Com a maioria dos produtos químicos, não se coloca a questão da aprovação ou não aprovação e a percentagem de remoção obtida pode ser utilizada no cálculo aproximado da concentração ambiental provável a utilizar na avaliação dos perigos associados aos produtos químicos. Os resultados tendem a seguir um padrão "tudo ou nada". Numa série de estudos de produtos químicos puros, observou-se uma percentagem de remoção de COD superior a 90 % em mais de três quartos dos produtos químicos que revelaram um grau significativo de biodegradabilidade e superior a 80 % em mais de 90 % deles.
15. Às concentrações utilizadas no presente ensaio (cerca de 10 mg C/l), relativamente poucos produtos químicos (por exemplo, tensoativos) estão presentes nas águas residuais. Alguns produtos químicos podem ter efeitos inibidores a estas concentrações, ao passo que a cinética da remoção de outros pode apresentar diferenças a baixas concentrações. É possível efetuar uma avaliação mais precisa da degradação por recurso a métodos modificados, utilizando concentrações baixas realistas do produto químico em estudo; os dados obtidos podem ser utilizados para o cálculo das constantes cinéticas. No entanto, as técnicas experimentais necessárias ainda não foram totalmente validadas, nem foram estabelecidos os modelos cinéticos que descrevem as reações de biodegradação (ver o apêndice 7).

#### SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

16. A fim de garantir uma execução correta do processo experimental, pode ser útil submeter a ensaio substâncias de comportamento conhecido, juntamente com os produtos químicos em estudo. Entre as primeiras contam-se o ácido adípico, o 2-fenilfenol, o 1-naftol, o ácido difénico, o ácido 1-naftóico, etc. (9)(10)(11).

#### REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS

17. Há muito menos referências de ensaios de simulação que de ensaios de determinação da biodegradabilidade "fácil". No caso dos produtos químicos com degradabilidade igual ou superior a 80 %, a reprodutibilidade entre ensaios simultâneos é boa (desvios de 10 a 15 %), embora a variabilidade aumente se o produto químico for menos degradável. Além disso, nas nove semanas em que decorreram os ensaios, alguns produtos químicos próximos do limite produziram resultados muito díspares (por exemplo, 10 % e 90 %) em diversas ocasiões.
18. Observou-se poucas diferenças nos resultados obtidos com os dois tipos de dispositivos, mas alguns produtos químicos exibiram uma degradação mais completa e constante na presença de águas residuais domésticas do que com o efluente sintético previsto no método da OCDE.

#### DESCRIÇÃO DO MÉTODO

##### Dispositivos

##### *Sistema de ensaio*

19. O sistema de ensaio de um produto químico é constituído por uma unidade de ensaio e uma unidade de controlo; contudo, quando apenas se efetuam análises específicas (biodegradação primária), só é necessária uma unidade de ensaio. Pode ser utilizada uma unidade de controlo para várias unidades de ensaio que utilizem o mesmo produto químico em estudo ou produtos químicos diferentes. Em caso de interligação de unidades de ensaio (apêndice 3), cada unidade deve ter a sua própria unidade de controlo. O sistema de ensaio pode consistir num modelo de estação de lamas ativadas — unidade de Husmann (apêndice 1, figura 1) ou vaso poroso (apêndice 1, figura 2). Em ambos os casos, são necessários recipientes de armazenagem de dimensões adequadas aos afluentes e efluentes, bem como bombas para a adição do afluente, com ou sem uma solução do produto químico em estudo.

20. Cada unidade da instalação de lamas ativadas é constituída por um tanque de arejamento com uma determinada capacidade (cerca de três litros de lamas ativadas) e um separador (clarificador secundário) com capacidade de cerca de 1,5 litros; até certo ponto, os volumes podem ser alterados, mediante o ajustamento da altura do separador. São admissíveis recipientes de dimensões diferentes, desde que processem cargas hidráulicas comparáveis. Se não for possível manter a temperatura do local de ensaio no intervalo desejado, recomenda-se a utilização de recipientes com circulação de água a temperatura regulada. Utiliza-se uma bomba de ar ou uma bomba de dosagem para transferir as lamas ativadas do separador para o recipiente de arejamento, de forma contínua ou intermitente, a intervalos regulares.
21. O sistema de vasos porosos é composto por um cilindro poroso interno com fundo cónico, montado num recipiente ligeiramente maior de plástico impermeável, com a mesma forma. Um material adequado para o recipiente é polietileno poroso com poros de 90 µm de diâmetro máximo e 2 mm de espessura. A separação das lamas do meio orgânico tratado é efetuada por passagem diferencial através da parede porosa. Os efluentes são recolhidos no espaço anular, do qual transitam para o recipiente de recolha. Dado não ocorrer precipitação, não se regista retorno de lamas. O sistema, no seu conjunto, pode ser montado num banho-maria com controlo termostático. Os vasos porosos obstruem-se e podem transbordar nas fases iniciais. Nesse caso, substituir o revestimento poroso por um revestimento novo, extraindo, por bombagem, as lamas do recipiente para um balde limpo e removendo o revestimento. Após a limpeza do cilindro impermeável exterior, inserir um novo revestimento e retransferir as lamas no recipiente. As lamas aderentes às faces obstruídas do revestimento são também removidas cuidadosamente e transferidas. Começar por limpar os recipientes obstruídos, por meio de um jato fino de água, de forma a remover a lama remanescente; enxaguar com uma solução diluída de hipoclorito de sódio e, seguidamente, com água, antes de proceder a uma lavagem completa com água.
22. Para o arejamento das lamas nos tanques de arejamento de ambos os sistemas podem utilizar-se métodos adequados, como, por exemplo, cubos sinterizados (rochas difusoras) e ar comprimido. Se necessário, o ar deve ser depurado, por passagem por um filtro adequado ou por lavagem. Deve circular pelo sistema uma quantidade de ar suficiente para manter as condições aeróbias e manter os flocos das lamas em suspensão permanente, durante o ensaio.

*Dispositivo de filtração ou centrifugação*

23. Dispositivo de filtração das amostras com filtros de membrana de porosidade adequada (diâmetro nominal da abertura: 0,45 µm), que adsorva substâncias orgânicas solúveis e liberte uma quantidade mínima de carbono orgânico. Caso se utilizem filtros que libertem carbono orgânico, lavá-los cuidadosamente com água quente, para eliminar o carbono orgânico lixiviável. Em alternativa, pode utilizar-se uma centrifugadora que produza 40 000 m/s<sup>2</sup>.

*Equipamento de análise*

24. Aparelhos que permitam determinar os seguintes parâmetros:
- COD (carbono orgânico dissolvido) e COT (carbono orgânico total), ou CQO (carência química de oxigénio),
  - substância específica, se necessário,
  - sólidos em suspensão, pH, concentração de oxigénio na água,
  - temperatura, acidez e alcalinidade,
  - amónio, nitritos e nitratos, se o ensaio for executado em condições de nitrificação.

*Água*

25. Água da rede de abastecimento, com menos de 3 mg/l de COD. Determinar a alcalinidade, se não for conhecida.
26. Água desionizada, com menos de 2 mg/l de COD.

*Meio orgânico*

27. Podem utilizar-se como meio orgânico águas residuais sintéticas, águas residuais domésticas ou uma combinação de ambas. Foi demonstrado (11) (14) que a utilização de águas residuais domésticas simples origina com frequência uma maior percentagem de remoção de COD, permitindo mesmo a remoção e biodegradação de alguns produtos químicos que não sofrem biodegradação quando se utiliza o efluente sintético OCDE. Além disso, a adição permanente ou intermitente de águas residuais domésticas estabiliza frequentemente as lamas ativadas, melhorando a capacidade de precipitação, que constitui um parâmetro essencial. Recomenda-se, pois, a utilização de águas residuais domésticas. Determinar a concentração de COD (ou a CQO) de cada novo lote de meio orgânico. Deve conhecer-se a acidez ou a alcalinidade do meio orgânico. Se esta acidez ou alcalinidade for baixa, pode ser necessário adicionar ao meio um tampão adequado (hidrogenocarbonato de sódio ou di-hidrogenofosfato de potássio), para manter o pH no tanque de arejamento a cerca de 7,5 ± 0,5, durante o ensaio. A quantidade de solução-tampão e o momento em que é adicionada devem ser decididos caso a caso. Quando as misturas são utilizadas de forma contínua ou intermitente, o seu teor de COD, ou a CQO, devem ser mantidos a um valor aproximadamente constante, por exemplo, diluindo com água.

*Águas residuais sintéticas*

28. Dissolver, por cada litro de água da rede de abastecimento, 160 mg de peptona; 110 mg de extrato de carne; 30 mg de ureia; 28 mg de hidrogenofosfato dipotássico anidro ( $K_2HPO_4$ ); 7 mg de cloreto de sódio (NaCl); 4 mg de cloreto de cálcio di-hidratado ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ); 2 mg de sulfato de magnésio hepta-hidratado ( $Mg_7SO_4 \cdot 7H_2O$ ). O efluente sintético OCDE constitui um exemplo e proporciona uma concentração média de COD no afluente de cerca de 100 mg/l. Em alternativa, podem utilizar-se composições mais próximas das das águas residuais em estudo, com uma concentração idêntica de COD. Se for necessário um afluente menos concentrado, diluir o efluente sintético, por exemplo, na proporção 1:1, com água da rede de abastecimento, de forma a obter uma concentração da ordem de 50 mg/l. O recurso a uma concentração mais baixa permitirá uma melhor proliferação dos organismos nitrificantes, pelo que esta modificação é aconselhável caso o estudo diga respeito à simulação de estações de tratamento de águas residuais com nitrificação. O efluente sintético, numa forma concentrada, pode ter por base água destilada e ser armazenado a cerca de 1 °C durante uma semana, no máximo. Se necessário, diluir com água da rede de abastecimento (este meio não é inteiramente satisfatório, uma vez que, por exemplo, a concentração de azoto é muito elevada e o teor de carbono relativamente baixo, mas não foram sugeridas alternativas melhores, exceto a adição de mais fosfato no tampão e de uma quantidade suplementar de peptona).

*Águas residuais domésticas*

29. Utilizar águas residuais recentemente decantadas, recolhidas diariamente numa instalação de tratamento que processe predominantemente esgotos domésticos. A amostra deve ser recolhida, antes de decantação primária, da conduta de alimentação do decantador, ou da conduta de alimentação da instalação de lamas ativadas, e ter a menor quantidade possível de partículas grosseiras. As águas residuais podem ser utilizadas após terem sido armazenadas durante vários dias (em geral, não mais de sete), a cerca de 4 °C, caso se apresentem provas de que o COD (ou a CQO) não baixou significativamente (ou seja, mais de 20 %) durante a armazenagem. A fim de evitar perturbações do sistema, o COD (ou a CQO) de cada novo lote deve ser ajustado, antes da utilização, para um valor constante, por exemplo, através de diluição com água da rede de abastecimento.

*Lamas ativadas*

30. As lamas ativadas para inoculação devem ser recolhidas num tanque de arejamento de uma estação de tratamento de águas residuais explorada corretamente ou numa unidade de lamas ativadas à escala laboratorial, que trate predominantemente águas residuais domésticas.

*Soluções-mãe da substância em estudo*

31. No caso de produtos químicos com solubilidade adequada, preparar soluções-mãe de reserva de concentrações apropriadas (por exemplo, 1 a 5 g/l) em água desionizada, ou na fração mineral do efluente sintético (no caso de produtos químicos insolúveis e voláteis, ver o apêndice 5). Determinar o COD e o carbono orgânico total (COT) da solução-mãe e repetir as medições para cada novo lote. Se a diferença entre o COD e o COT for superior a 20 %, verificar a solubilidade em água do produto químico em estudo. Comparar o COD ou a concentração do produto químico em estudo determinados por análise específica da solução-mãe com o valor nominal, de forma a averiguar se a recuperação é suficiente (em geral, deve ser superior a 90 %). Verificar, em especial no caso das dispersões, se o COD pode ou não ser utilizado como parâmetro analítico, ou se é necessário utilizar uma técnica analítica específica para o produto químico em causa. Com as dispersões, é necessário proceder à centrifugação das amostras. Para cada novo lote, determinar o COD, a CQO ou o produto químico em estudo por meio de uma análise específica.
32. Determinar o pH da solução-mãe. A ocorrência de valores extremos indica que a adição do produto químico pode influenciar o pH das lamas ativadas no sistema de ensaio. Neste caso, neutralizar a solução de reserva com pequenas quantidades de ácido ou de base, de forma a obter um pH de  $7,0 \pm 0,5$ , evitando, contudo, a precipitação do produto químico em estudo.

## PROCEDIMENTO

33. O procedimento descrito é aplicável a unidades de instalações de lamas ativadas; no caso de um sistema de vasos porosos, tem de sofrer adaptações ligeiras.

*Preparação do inóculo*

34. No início do ensaio, inocular o sistema com lamas ativadas ou com um inóculo com baixa concentração de microrganismos. Manter o inóculo arejado à temperatura ambiente, até ser utilizado (em menos de 24 horas). No primeiro caso, colher uma amostra de lama ativada do tanque de arejamento de uma estação de tratamento de águas residuais biológica que funcione de forma eficiente, ou de uma estação de tratamento à escala laboratorial, que processe essencialmente efluentes domésticos. Se for necessário simular condições de nitrificação, utilizar lamas provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais com nitrificação. Determinar a concentração de sólidos em suspensão e, se necessário, concentrar as lamas por sedimentação, de forma a que o volume adicionado ao sistema de ensaio seja mínimo. Assegurar uma concentração inicial de matéria seca da ordem de 2,5 g/l.
35. No segundo caso, utilizar como inóculo 2 a 10 ml/l de efluente proveniente de uma estação de tratamento de águas residuais domésticas biológica. Para dispor do maior número possível de diferentes espécies de bactérias, pode ser útil adicionar inóculos provenientes de várias fontes, como, por exemplo, águas de superfície. Neste caso, as lamas ativadas desenvolver-se-ão e proliferarão no sistema de ensaio.

*Introdução de meio orgânico*

36. Assegurar que os recipientes do afluente e do efluente, bem como a conduta entre o primeiro e o segundo, são bem limpos, de forma a eliminar qualquer proliferação de flora microbiana antes do ensaio e durante o mesmo. Montar os sistemas de ensaio num compartimento com controlo de temperatura (em geral, na gama 20-25 °C) ou utilizar unidades com circulação de água. Preparar um volume suficiente de meio orgânico (pontos 27 e 29). Começar por encher o tanque de arejamento e o separador com o meio orgânico, adicionando em seguida o inóculo (pontos 34, 35). Iniciar o arejamento de modo a manter as lamas em suspensão, em condições aeróbias, e começar a introdução do afluente e a reciclagem das lamas decantadas. Transferir o meio orgânico dos tanques de armazenagem para os recipientes de arejamento (pontos 20 e 21) das unidades de ensaio e de controlo, e recolher os respetivos efluentes em tanques de armazenagem idênticos. Para obter o tempo de retenção hidráulica normal (6 h), o meio orgânico é bombeado a 0,5 l/h. Para confirmar este caudal, medir a quantidade diária de meio orgânico adicionado, registando o decréscimo dos volumes do meio nos recipientes de armazenagem. Para determinar os efeitos das descargas intermitentes e descargas intensivas de produtos químicos, seriam necessárias outras formas de dosagem.
37. Se o meio orgânico for preparado para utilização por um período superior a um dia, é necessário arrefecê-lo a cerca de 4 °C, ou recorrer a outros métodos adequados de conservação, para evitar a proliferação de microorganismos e a ocorrência de biodegradação fora das unidades de ensaio (ponto 29). Se for utilizado efluente sintético, pode preparar-se, e armazenar-se a cerca de 4 °C, uma solução-mãe concentrada (por exemplo, com uma concentração 10 vezes superior à normal - ponto 28). Esta solução pode ser diluída com um volume adequado de água da rede de abastecimento, antes da utilização. Em alternativa, pode ser bombeada diretamente, sendo o referido volume adequado de água da rede de abastecimento bombeado separadamente.

*Introdução do produto químico em estudo*

38. Adicionar um volume adequado da solução-mãe do produto químico em estudo (ponto 31) ao recipiente de armazenagem de efluente ou introduzi-la diretamente, com uma bomba, no tanque de arejamento. A concentração média normal do produto químico em estudo no afluente deve estar compreendida entre 10 mg/l e 20 mg/l de COD, não devendo exceder 50 mg/l. Se a solubilidade em água do produto químico for baixa, ou se for provável a ocorrência de efeitos tóxicos, reduzir a concentração para 5 mg/l de COD ou menos, mas apenas se estiver disponível e puder ser aplicado um método analítico específico (os produtos químicos dispersos que forem pouco solúveis em água podem ser adicionadas por recurso a técnicas especiais de dosagem — ver o apêndice 5).
39. Começar a adicionar o produto químico em estudo após um período necessário à estabilização do sistema e à eliminação eficiente (cerca de 80 %) do COD do meio orgânico. Antes da adição do produto químico, é importante verificar se todas as unidades estão a funcionar de forma igualmente eficaz; se tal não for o caso, justifica-se, geralmente, misturar as lamas e redistribuir volumes iguais pelas unidades. Quando se utiliza um inóculo de cerca de 2,5 g/l (massa a seco) de lama ativada, o produto químico em estudo pode ser adicionado no início do ensaio, uma vez que a adição direta de quantidades crescentes desde o início apresenta a vantagem de as lamas ativadas poderem adaptar-se melhor à substância. Independentemente do método de adição, recomenda-se que o caudal e/ou os volumes no(s) recipiente(s) de armazenagem sejam medidos com intervalos regulares.

*Processamento das lamas ativadas*

40. Durante o ensaio, independentemente do inóculo utilizado, a concentração das lamas ativadas sólidas estabiliza-se, em geral, entre determinados limites, no intervalo de 1 a 3 g/l (massa a seco), em função da natureza e da concentração do meio orgânico, das condições de funcionamento, da natureza dos microrganismos presentes e da influência do produto químico em estudo.
41. Determinar os sólidos em suspensão nos tanques de arejamento, pelo menos, uma vez por semana e eliminar o excesso de lamas, de forma a manter a concentração na gama 1 g/l a 3 g/l (massa a seco), ou manter constante o tempo de permanência médio das lamas (em geral, na gama de 6 a 10 dias). Se, por exemplo, for escolhido um tempo de retenção das lamas de oito dias, remover diariamente e eliminar 1/8 do volume das lamas ativadas contidas no tanque de arejamento. Efetuar esta operação diariamente ou, de preferência, recorrer a um dispositivo automático de bombagem intermitente. O facto de manter a concentração de sólidos em suspensão a níveis constantes, ou dentro de limites restritos, não permite obter um valor constante do tempo de retenção das lamas, parâmetro que condiciona a concentração do produto químico em estudo no efluente.
42. Durante todo o ensaio, remover, pelo menos uma vez por dia, as lamas aderentes às paredes do tanque de arejamento e do separador, de forma a repô-las em suspensão. Verificar e limpar regularmente todas as tubagens, para impedir a formação de biofilmes. Transferir a lama decantada do separador para o tanque de arejamento, de preferência por bombagem intermitente. Embora não ocorra reciclagem no sistema de vasos porosos, importa assegurar que são inseridos vasos interiores limpos antes de o volume no tanque aumentar significativamente (ponto 21).
43. Nas unidades de Hummann, pode observar-se precipitação deficiente e perda de lamas. Estas ocorrências podem ser retificadas através de um dos procedimentos que se referem de seguida, aplicados em paralelo nas unidades de ensaio e de controlo:

- podem adicionar-se a intervalos regulares (por exemplo, semanalmente) lamas frescas ou floculante (por exemplo, 2 ml de solução de 50 g/l  $\text{FeCl}_3$  por tanque), verificando, porém, que não ocorre qualquer reação nem precipitação do produto químico em estudo com  $\text{FeCl}_3$ ,
- a bomba de ar pode ser substituída por uma bomba peristáltica que proporcione um caudal de recirculação das lamas aproximadamente igual ao caudal do afluente e o desenvolvimento de uma zona anaeróbia nas lamas decantadas (a geometria da bomba de ar limita o caudal mínimo das lamas de retorno a cerca de doze vezes o caudal do afluente),
- as lamas podem ser bombeadas por intermitência do separador do tanque de arejamento (por exemplo, 5 minutos em cada 2,5 h, para reciclar de 1 a 1,5 l/h),
- pode utilizar-se um agente antiespumante não tóxico (por exemplo, óleo de silicone), numa concentração mínima, para evitar as perdas através das espumas,
- pode-se fazer borbulhar ar nas lamas do separador, em rajadas curtas (por exemplo, 10 segundos por hora),
- o meio orgânico pode ser introduzido no tanque de arejamento a intervalos regulares (por exemplo, 3 a 10 minutos por hora).

#### *Amostragem e análise*

44. Medir, a intervalos regulares, a concentração de oxigénio dissolvido, a temperatura e o pH das lamas ativadas, nos tanques de arejamento. Garantir que esteja sempre presente oxigénio em quantidade suficiente ( $> 2$  mg/l) e a temperatura seja mantida na gama pretendida (em geral, de 20 °C a 25 °C). Manter o pH a  $7,5 \pm 0,5$ , por adição de pequenas quantidades de base ou ácido inorgânicos no tanque de arejamento ou no afluente, ou aumentando a capacidade-tampão do meio orgânico (ver ponto 27). A nitrificação produz ácido; a oxidação de 1 mg de azoto produz o equivalente de cerca de 7 mg de  $\text{CO}_3^{2-}$ . A frequência das medições depende do parâmetro a medir e da estabilidade do sistema, podendo variar consoante as medições sejam diárias ou semanais.
45. Medir o COD ou a CQO nos afluentes dos tanques de ensaio e de controlo. Medir a concentração do produto químico em estudo no afluente respetivo, através de uma análise específica ou por estimativa, com base na sua concentração na solução-mãe (ponto 31), no volume utilizado e na quantidade de águas residuais tratadas na unidade de ensaio. Recomenda-se o cálculo da concentração do produto químico em estudo, a fim de reduzir a variabilidade dos valores obtidos para a concentração.
46. Recolher amostras adequadas nos efluentes (por exemplo, amostras compósitas em 24 h), e filtrar com uma membrana de porosidade 0,45  $\mu\text{m}$ , ou centrifugar a cerca de 40 000  $\text{m/s}^2$  durante 15 minutos. Deve recorrer-se à centrifugação se a filtragem for difícil. Determinar o COD ou a CQO pelo menos em duplicado, para avaliar a biodegradação final e, se necessário, a biodegradação primária, através de uma análise específica do produto químico em estudo.
47. A baixas concentrações, a utilização da CQO pode originar problemas analíticos, pelo que se recomenda apenas para concentrações suficientemente elevadas do produto químico em estudo (cerca de 30 mg/l). Além disso, no caso de produtos químicos fortemente adsorventes, recomenda-se a determinação da quantidade de produto químico em estudo adsorvida nas lamas, por recurso a uma técnica analítica específica.
48. A frequência de amostragem depende da duração prevista do ensaio. Recomenda-se uma frequência de três vezes por semana. Se as unidades estiverem a funcionar eficazmente, prever um período de adaptação de uma semana a, no máximo, seis semanas após a adição do produto químico em estudo, para que seja atingido um estado estacionário. Para a avaliação do resultado do ensaio, obter, de preferência, um mínimo de 15 valores válidos na fase de patamar (ponto 59), que dura, em geral, três semanas. O ensaio pode ser concluído se for observado um grau de eliminação suficiente (por exemplo, superior a 90 %) e se estiverem disponíveis os 15 valores referidos, representativos de análises efetuadas todos os dias durante três semanas. A duração do ensaio não deve, em geral, exceder 12 semanas após a adição do produto químico em estudo.
49. Se as lamas nitrificarem e se pretender estudar os efeitos do produto químico em estudo na nitrificação, determinar o amónio e/ou os nitritos, bem como os nitratos, em amostras dos efluentes das unidades de ensaio e de controlo, pelo menos uma vez por semana.
50. Todas as análises (em especial as determinações de azoto) devem ser efetuadas tão rapidamente quanto possível. Se for necessário adiar a realização das análises, armazenar as amostras a cerca de 4 °C, na obscuridade, em garrafas hermeticamente fechadas. Se for necessário armazenar as amostras por um período superior a 48 horas, conservá-las por ultracongelamento, acidificação (por exemplo, com 10 ml/l de solução de ácido sulfúrico a 400 g/l) ou por adição de uma substância tóxica adequada (por exemplo, 20 ml/l de uma solução de cloreto de mercúrio (II) a 10 g/l). Assegurar que a técnica de conservação não influencia os resultados da análise.



*Interligação das unidades de ensaio*

51. Caso se recorra a uma interligação (apêndice 3), efetuar diariamente trocas da mesma quantidade de lamas ativadas (150 ml a 1 500 ml, no caso de tanques de arejamento que contenham 3 litros de fase líquida) entre os tanques de arejamento da unidade de ensaio e da unidade de controlo. Se o produto químico em estudo for fortemente adsorvido pelas lamas, alterar apenas o sobrenadante dos separadores. Em ambos os casos, utilizar um fator de correção para calcular os resultados dos ensaios (ponto 55).

## DADOS E RELATÓRIOS

**Tratamento dos resultados**

52. Calcular a percentagem de eliminação do produto químico em estudo, em termos de COD ou de CQO, para cada avaliação programada, por recurso à equação:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

em que

$D_t$  = % de eliminação do COD ou da CQO no instante  $t$

$C_s$  = COD ou CQO no afluente devidos ao produto químico em estudo, estimado, de preferência, a partir da solução-mãe (mg/l)

$E$  = valor medido de COD ou CQO no efluente em estudo, no instante  $t$  (mg/l)

$E_o$  = valor medido de COD ou CQO no efluente de controlo, no instante  $t$  (mg/l)

53. O grau de eliminação de COD ou de CQO do meio orgânico da unidade de controlo é uma informação útil para avaliar a atividade de biodegradação das lamas ativadas, durante o ensaio. Calcular a percentagem de eliminação por recurso à equação:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

em que

$D_B$  = % de eliminação do COD ou da CQO do meio orgânico na unidade de controlo, no instante  $t$

$C_M$  = COD ou de CQO do meio orgânico no afluente de controlo (mg/l)

Como opção, calcular a percentagem de eliminação do COD ou da CQO devida ao meio orgânico e ao produto químico em estudo na unidade de ensaio, com base na seguinte equação:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

em que

$D_T$  = % de eliminação do COD ou da CQO total do afluente em estudo

$C_T$  = COD ou CQO total do afluente em estudo, ou calculados a partir das soluções-mãe (mg/l)

54. Calcular a remoção do produto químico em estudo, se determinada por um método analítico específico, em cada instante, com base na equação:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

em que

$D_{ST}$  = % de eliminação primária do produto químico em estudo, no instante  $t$

$S_i$  = concentração medida ou estimada do produto químico em estudo no afluente (mg/l)

$S_e$  = concentração medida ou estimada do produto químico em estudo no efluente, no instante  $t$  (mg/l)

55. Caso tenha sido utilizado o modo de interligação, compensar, através de um fator de correção, a diluição do produto químico em estudo no tanque de arejamento devida à substituição das lammas (ver o apêndice 3). Se tiver sido utilizado um tempo de retenção hidráulica médio de 6 h e se tiver procedido à substituição de metade do volume de lammas ativadas contido no tanque de arejamento, é necessário corrigir os valores de eliminação diária determinados ( $D_t$ , ponto 52), de forma a obter o verdadeiro grau de eliminação,  $D_{tc}$ , do produto químico em estudo, através da seguinte equação:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

#### Apresentação dos resultados do ensaio

56. Traçar o gráfico da percentagem de remoção,  $D_t$  (ou  $D_{tc}$ ) e  $D_{st}$ , consoante o caso, em função do tempo (ver o apêndice 2). A forma da curva de remoção do produto químico em estudo (em relação ao próprio produto ou na forma de COD) permite tirar algumas conclusões sobre o processo de remoção.

#### Adsorção

57. Caso se observe uma elevada remoção de COD do produto químico em estudo desde o início do ensaio, o produto em causa é, provavelmente, removido por adsorção nos sólidos das lammas ativadas. É possível comprovar este fenómeno através da determinação da quantidade de produto químico em estudo adsorvido, por recurso a um método de análise específico. Não é habitual que a eliminação do COD de produtos químicos adsorvíveis se mantenha a um nível elevado durante todo o ensaio; em geral, observa-se um elevado grau de eliminação no início, que baixa progressivamente para um valor de equilíbrio. Contudo, se o produto químico adsorvível em estudo tiver causado, de qualquer forma, a aclimação da flora microbiana, a remoção do seu COD poderá aumentar posteriormente, estabilizando-se em valores elevados.

#### Fase de latência

58. Muitos produtos químicos em estudo passam por uma fase de latência, antes de ocorrer a biodegradação completa, nomeadamente nos ensaios estáticos de rastreio. Na fase de latência, ocorre a aclimação ou adaptação das bactérias responsáveis pela degradação, não se observando praticamente qualquer eliminação do produto químico em estudo; a proliferação das bactérias inicia-se em seguida. Esta fase termina, iniciando-se a fase de degradação, quando for eliminada cerca de 10 % da quantidade inicial de produto químico em estudo (após a adsorção, caso ocorra). Em geral, a fase de latência é muito variável e pouco reprodutível.

#### Fase de patamar

59. A fase de patamar da curva de eliminação de um ensaio contínuo é definida como a fase em que ocorre a degradação máxima. Deve durar, pelo menos, três semanas, durante as quais importa determinar cerca de 15 valores válidos.

#### Grau de eliminação médio do produto químico em estudo

60. Calcular o valor médio a partir dos valores de eliminação ( $D_t$ ) obtidos para o produto químico em estudo na fase de patamar. O grau de eliminação do produto químico em estudo é arredondado ao número inteiro mais próximo (1 %). Recomenda-se também o cálculo do intervalo de confiança de 95 % do valor médio.

#### Eliminação do meio orgânico

61. Desenhar o gráfico da percentagem de eliminação do COD ou da CQO do meio orgânico na unidade de controlo ( $D_B$ ) em função do tempo. Indicar o grau de eliminação médio da mesma forma que para o produto químico em estudo (ponto 60).

#### Indicação da biodegradação

62. Se o produto químico em estudo não for adsorvido de forma significativa pelas lammas ativadas e a curva de eliminação tiver a forma característica de uma curva de biodegradação com fases de latência, degradação e patamar (pontos 58 e 59), a remoção determinada pode ser atribuída com confiança à biodegradação. Se ocorrer uma elevada remoção inicial, o ensaio de simulação não permite distinguir os processos de eliminação biológicos dos abióticos. Nesses casos, e noutros em que existam dúvidas quanto a biodegradação (por exemplo, se ocorrer separação), analisar o produto químico em estudo adsorvido ou efetuar mais ensaios estáticos de biodegradação com base em parâmetros que comprovem claramente os processos biológicos. Trata-se, designadamente, dos métodos baseados no consumo de oxigénio [capítulo C.4, D, E e F do presente anexo (6)], de um ensaio com medição do dióxido de carbono produzido [capítulo C.4 C do presente anexo (6)] ou do método de *headspace* da ISO (18), utilizando um inóculo pré-exposto do ensaio de simulação. Se tiverem sido determinadas a remoção do COD e a eliminação das substâncias específicas, a ocorrência de diferenças significativas entre as percentagens (primeiro valor superior ao segundo) indicam a presença nos efluentes de substâncias orgânicas intermediárias cuja degradação pode ser mais difícil que a da substância de origem.

*Validade dos resultados*

63. Obtêm-se informações sobre o comportamento do inóculo em matéria de biodegradação se for determinado o grau de eliminação do meio orgânico (ponto 53) da unidade de controlo. Considerar o ensaio válido se, decorridas duas semanas, o grau de eliminação do COD ou da CQO da(s) unidade(s) de controlo exceder 80 % e não se registarem quaisquer ocorrências relevantes.
64. Se tiver sido utilizada uma substância de referência facilmente biodegradável, o grau de biodegradação ( $D_T$ , ponto 52) deve ser superior a 90 %.
65. Se o ensaio for efetuado em condições de nitrificação, a concentração média nos efluentes devem ser inferior a 1 mg/l de azoto amoniacal e a 2 mg/l de azoto na forma de nitritos.
66. Se esses critérios (pontos 63-65) não forem cumpridos, repetir o ensaio utilizando um inóculo de origem diferente, submeter a ensaio uma substância de referência e rever todos os procedimentos experimentais.

**Relatório do ensaio**

67. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

*Produto químico em estudo:*

- dados de identificação,
- natureza física e, quando pertinente, propriedades físico-químicas.

*Condições de ensaio:*

- tipo de sistema de ensaio; quaisquer alterações introduzidas para o ensaio de produtos químicos insolúveis e voláteis,
- tipo de meio orgânico,
- proporção e natureza das águas residuais provenientes de indústrias, se conhecidas,
- inóculo: natureza e local(is) de amostragem, concentração e eventual pré-tratamento,
- solução-mãe do produto químico em estudo: teor de COD e COT; forma de preparação, caso se trate de uma suspensão; concentração de ensaio utilizada; fundamentação de um eventual afastamento da gama de 10 a 20 mg/l de COD; método de adição; data da primeira adição; quaisquer alterações,
- tempo de permanência médio das lamas e tempo médio de retenção hidráulica; método de remoção das lamas; métodos para evitar a mistura e a perda de lamas, etc.,
- técnicas de análise utilizadas,
- temperatura de ensaio,
- qualidades das lamas misturadas, índice de volume das lamas, mistura de sólidos em suspensão no meio fluido,
- eventuais desvios aos procedimentos normalizados e quaisquer ocorrências que possam ter afetado os resultados.

*Resultados do ensaio:*

- todos os valores medidos (COD, CQO, análises específicas, pH, temperatura, concentração de oxigénio, sólidos em suspensão, substâncias azotadas, se for caso disso,
- todos os valores calculados dos parâmetros  $D_t$  (ou  $D_{t0}$ ),  $D_B$ ,  $D_{St}$ , na forma de quadro e a partir das curvas de eliminação,
- informações sobre as fases de latência e de patamar, a duração do ensaio, o grau de eliminação do produto químico em estudo e do meio orgânico na unidade de controlo, juntamente com dados estatísticos e conclusões sobre a biodegradabilidade e a validade do ensaio,
- discussão dos resultados.

## REFERÊNCIAS:

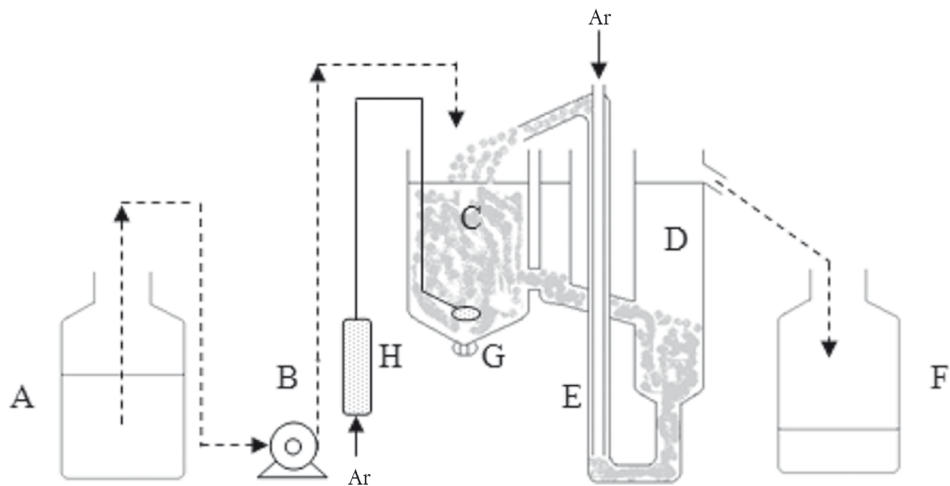
- (1) Swisher RD (1987). "Surfactant Biodegradation", 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.
  - (2) Governo alemão (1962): Verordnung über die Abbaubarkeit von Detergentien in Wasch- und Reinigungsmitteln. *Bundesgesetzblatt*, Pt.1 No.49: 698-706.
  - (3) Painter H.A., King E.F. (1978a). WRC porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, Reino Unido.
  - (4) Painter H.A., King E.F. (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. *Wat. Res.* 12: 909-915.
  - (5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.
  - (6) Capítulo C.4 deste anexo: "Determinação da biodegradabilidade "fácil".
  - (7) Capítulo C.12 deste anexo: "Biodegradação - Ensaio L.A.S.C. modificado".
  - (8) Capítulo C.19 deste anexo: "Estimativa do valor do coeficiente de adsorção ( $K_{OC}$ ) em solos e em lamas de depuração por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)".
  - (9) Gerike P., Fischer W.K. (1979): A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. *Ecotox. Env. Saf.* 3:157-173.
  - (10) Gerike P., Fischer W.K. (1981), como (9), II Additional results and conclusions. *Ecotox. Env. Saf.* 5: 45-55.
  - (11) Painter H.A., Bealing D, (1989): Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen B.N., Muntau H., Angeletti G.
  - (12) ISO 11733 (1995; revista em 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium - activated sludge simulation test.
  - (13) Birch R.R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Español. Deterg.: 33-48.
  - (14) Birch R.R. (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. *J.A.O.C.S.* 61 (2): 340-343.
  - (15) Gerike P., Fischer W.K., Holtmann W. (1980): Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. *Wat.Res.* 14: 753-758.
  - (16) Baumann U., Kuhn G., Benz M. (1998): Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF — *Z. Umweltchem. Ökotox.* 10: 214-220.
  - (17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. p. 91-98 ISBN 011 751661 9.
  - (18) ISO 14593 (1998). Water Quality — Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.
-

## Apêndice 1

Figura 1

## Equipamentos utilizados para avaliar a biodegradação

Unidade de Husmann

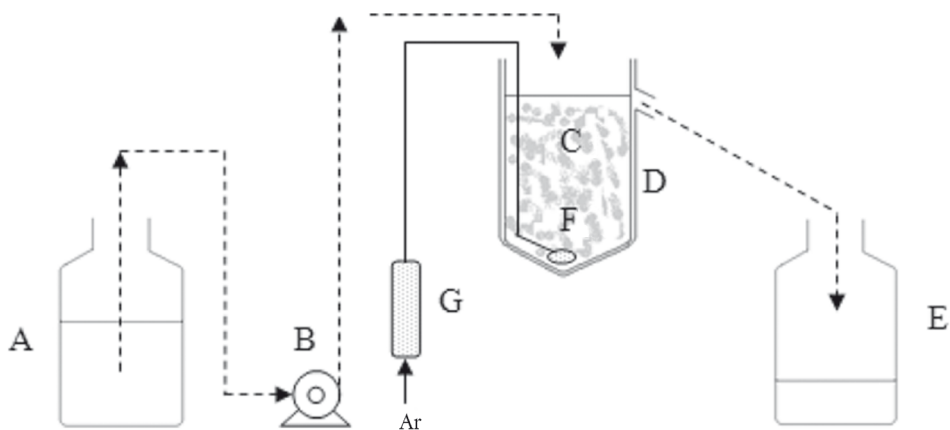


- |  |                            |
|--|----------------------------|
| A. Tanque de armazenagem                 | E. Bomba de ar comprimido  |
| B. Bomba doseadora                       | F. Tanque de recolha       |
| C. Câmara de arejamento (capacidade 3 l) | G. Arejador                |
| D. Tanque de decantação                  | H. Medidor do caudal de ar |

Figura 2

## Equipamentos utilizados para avaliar a biodegradação

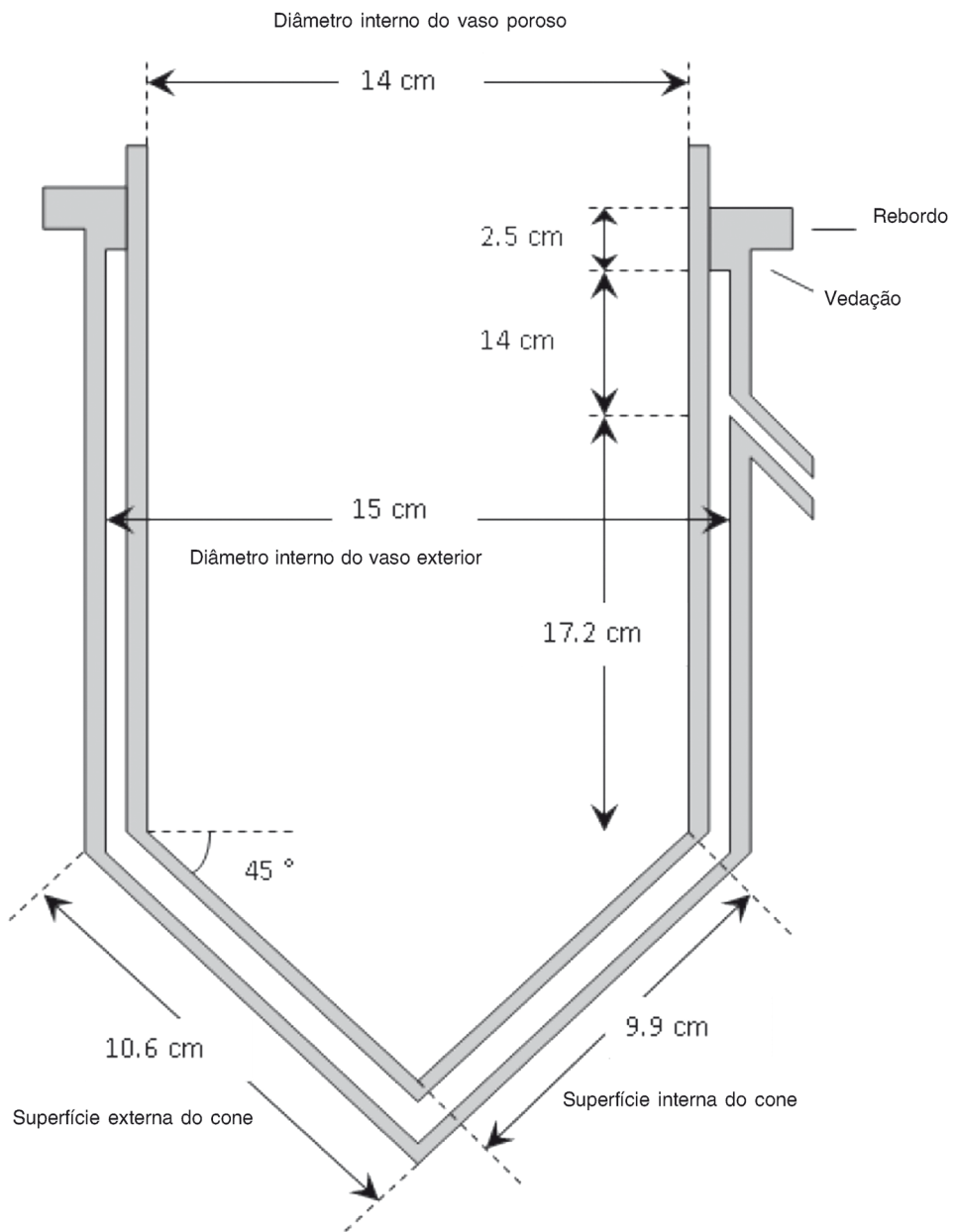
Vaso poroso



- |                                    |                       |
|------------------------------------|-----------------------|
| A. Tanque de armazenagem           | E. Tanque de recolha  |
| B. Bomba de dosagem                | F. Difusor            |
| C. Tanque poroso de arejamento     | G. Caudalímetro de ar |
| D. Recipiente exterior impermeável |                       |

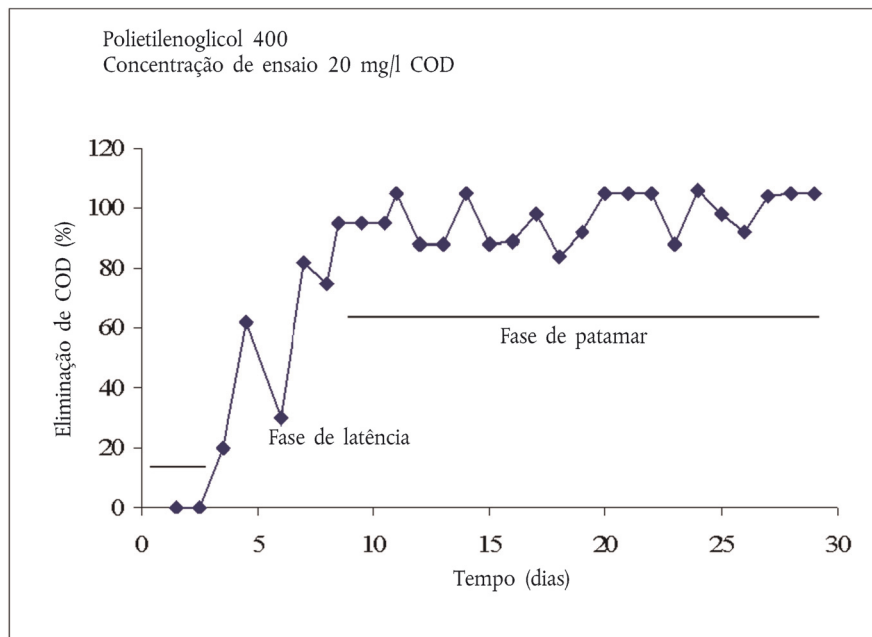
Figura 3

**Pormenor do vaso poroso de arejamento de três litros**



## Apêndice 2

## Exemplo de curva de eliminação



## Apêndice 3

[INFORMATIVO]

## INTERLIGAÇÃO DAS UNIDADES DE ENSAIO

Para tentar igualizar as populações microbianas nas lamas de uma unidade de ensaio que processa águas residuais com um produto químico em estudo e de uma unidade de controlo que apenas processa efluentes, procede-se a uma transferência de lamas diária (1). Este processo designa-se por interligação e o método é conhecido por método das unidades interligadas. A interligação começou por ser efetuada por recurso a unidades de Husmann de lamas ativadas, mas, posteriormente, foram também utilizadas unidades de vasos porosos (2) (3). Não foram registadas diferenças significativas, em termos de resultados, entre unidades interligadas ou não, quer se trate de unidades Husmann ou de vasos porosos, pelo que não se justifica o dispêndio de tempo e energia com a interligação de unidades.

O intercâmbio de lamas pode dar a impressão de ocorrência de uma remoção considerável, uma vez que uma parte do produto químico em estudo nas lamas transferidas e as concentrações do mesmo nos efluentes de ensaio e de controlo são praticamente iguais. É, pois, necessário utilizar fatores de correção, consoante a fração em causa e o tempo médio de retenção hidráulica. A referência (1) contém mais pormenores para o cálculo.

Calcular o valor corrigido do grau de eliminação do COD ou da CQO utilizando a seguinte fórmula geral:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12) \%$$

em que:

$D_{tc}$  = % corrigida de eliminação do COD ou da CQO

$D_t$  = % determinada de eliminação do COD ou da CQO

$a$  = fração trocada do volume das unidades de lamas ativadas

$r$  = tempo médio de retenção hidráulica (h)

Se, por exemplo, metade do volume do recipiente de arejamento for trocada ( $a = 0,5$ ) e o tempo médio de retenção hidráulica for de 6 h, a fórmula de correção é a seguinte:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

## REFERÊNCIAS

- (1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975): Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. *Wat. Res.* 9: 1131-1135.
- (2) Painter HA, Bealing DJ (1989): Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. p. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- (3) Painter HA, King EF (1978): Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, Reino Unido.



## Apêndice 4

## AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DAS LAMAS ATIVADAS

**Processamento dos produtos químicos em estudo**

1. Um produto químico (ou uma água residual) pode não ser degradado ou removido no ensaio de simulação, podendo mesmo apresentar um efeito inibidor nos microrganismos presentes nas lamias. Alguns produtos químicos são biodegradados a baixas concentrações, mas são inibidores a concentrações mais elevadas (hormese). Os efeitos inibidores podem ser detetados numa fase precoce ou podem ser determinados por recurso a um ensaio de toxicidade, utilizando um inóculo semelhante ou idêntico ao utilizado no ensaio de simulação (1). Estes métodos consistem na inibição do consumo de oxigénio (capítulo C.11 do presente anexo (2) e norma ISO 8192, n.º 3) ou na inibição do crescimento dos organismos das lamias (ISO 15522, n.º 4).
2. No ensaio de simulação, observa-se inibição se a diferença de teores de COD ou CQO entre os efluentes do recipiente de ensaio e do recipiente de controlo for superior ao COD correspondente ao produto químico em estudo. Por outras palavras, a percentagem de remoção de COD (ou de CBO, CQO, e/ou  $\text{NH}_4^+$ ) do meio orgânico tratado baixará devido à presença do produto químico em estudo. Caso tal suceda, o ensaio deve ser repetido, reduzindo-se a concentração do produto químico em estudo até ser atingido um nível em que não ocorra inibição e, eventualmente, até o produto ser biodegradado. Se o produto químico, ou as águas residuais, em estudo revelarem efeitos negativos no processo a todas as concentrações testadas, isso indica que o processamento biológico do produto é difícil, ou mesmo impossível; poderá, contudo, ser interessante repetir o ensaio com lamias ativadas de origem diferente e/ou submetendo as lamias a uma aclimação mais gradual.
3. Reciprocamente, se o produto químico em estudo for bioeliminada no primeiro ensaio de simulação, a sua concentração deve ser aumentada, caso se pretenda conhecer os seus possíveis efeitos de inibição.
4. Nas tentativas para determinar os graus de inibição, importa recordar que as populações colonizadoras das lamias ativadas podem variar, pelo que, com o tempo, os microrganismos podem exibir tolerância a uma substância inibidora.
5. Cálculo do grau de inibição:

A percentagem global de remoção ( $R_o$ ), de CBO, COD, CQO, etc., das unidades de ensaio e de controlo, pode ser calculada com base na equação:

$$R_o = 100 (I - E)/I \%$$

em que:

I = concentração de CBO, DOC, COD, etc. no afluente, nos recipientes de ensaio ou de controlo (mg/l)

E = mesmas concentrações no efluente (mg/l).

Os valores de I e E devem ser corrigidos para ter em conta o COD atribuível ao produto químico em estudo nas unidades de ensaio, sem o que os cálculos da percentagem de inibição serão incorretos.

O grau de inibição decorrente da presença do produto químico em estudo é calculado a partir da equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 (R_c - R_t)/R_c$$

em que:

$R_c$  = percentagem de remoção nos recipientes de controlo

$R_t$  = percentagem de remoção nos recipientes de ensaio

## REFERÊNCIAS

- (1) Reynolds L *et al.* (1987): Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. *Chemosphere* 16: 2259.
- (2) Captítulo C.11 deste anexo: "Biodegradação — Lamias Ativadas: Ensaio de Inibição da Respiração".
- (3) ISO 8192 (2007) Water quality — Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.
- (4) ISO 15522 (1999) Water Quality — Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

## Apêndice 5

**Produtos químicos em estudo pouco solúveis em água — substâncias voláteis****Produtos químicos pouco solúveis em água**

Foram publicados poucos relatórios sobre ensaios de simulação de tratamento de águas residuais com produtos químicos pouco solúveis ou insolúveis em água (1) (2) (3).

Não existe um método único de dispersão da substância em estudo aplicável a todos os produtos químicos insolúveis. Dois dos quatro tipos de métodos descritos na norma ISO 10634 (4) afiguram-se adequados à dispersão dos produtos químicos destinados a ensaios de simulação: trata-se do recurso a agentes emulsionantes e/ou à energia ultrassónica.

Deve determinar-se a estabilidade da dispersão em períodos de, pelo menos, 24 horas.

As dispersões, devidamente estabilizadas, contidas num recipiente com agitação constante (ponto 38), são transferidas para um tanque de arejamento separadamente das águas residuais domésticas ou sintéticas.

Se as dispersões forem estáveis, investigar de que forma o produto químico poderá ser determinado na forma dispersa. É improvável que a determinação do COD seja adequada, devendo, por isso, definir-se para a análise do produto químico um método específico passível de ser aplicado a efluentes, sólidos provenientes de efluentes e lamas ativadas. Pode, então, determinar-se o comportamento do produto no processo de simulação das lamas ativadas, nas fases líquida e sólida. Deve, pois, estabelecer-se um "balanço de massas" para decidir se o produto químico em estudo foi biodegradado. No entanto, esse parâmetro indica apenas a biodegradação primária. Para comprovar a biodegradação final, deve utilizar-se um ensaio respirométrico da biodegradabilidade imediata (capítulo C.4 do presente anexo (5) C, F ou D), utilizando como inóculo lamas expostas ao produto químico em estudo no ensaio de simulação.

**Produtos químicos voláteis**

A simulação do tratamento das águas residuais com produtos químicos voláteis é discutível e problemática. Tal como no caso dos produtos químicos de baixa solubilidade em água, têm sido publicados muito poucos relatórios sobre ensaios de simulação com produtos químicos voláteis. Um dispositivo de mistura de tipo clássico pode ser adaptado, tapando os tanques de arejamento e de sedimentação, medindo e controlando o fluxo de ar por recurso a fluxómetros e fazendo passar os gases libertados por coletores, para recolha das matérias orgânicas voláteis. Em alguns casos, utiliza-se uma bomba de vácuo para drenar os gases através de um coletor a frio ou de um coletor com purga que contenha Tenax e sílica-gel, para análise por cromatografia em fase gasosa. O produto químico em estudo presente no coletor pode ser determinado por via analítica.

O ensaio é efetuado em duas fases. Na primeira fase, as unidades são utilizadas sem lamas, mas com águas residuais sintéticas, sendo o produto químico em estudo bombeado para o tanque de arejamento. São colhidas amostras de afluente, efluente e de gases libertados e analisadas para deteção do produto químico em estudo, durante alguns dias. A percentagem ( $R_{v_1}$ ) deste removida do sistema pode calcular-se a partir dos dados recolhidos.

Em seguida, realiza-se o ensaio biológico normal (com lamas), em condições operacionais idênticas às utilizadas no ensaio de remoção. Efetua-se também medições do COD ou da CQO, para verificar se as unidades estão a funcionar de forma eficaz. Ocasionalmente, efetua-se análises para determinar a concentração de produto químico em estudo no afluente, no efluente e nos gases libertados, na primeira parte do ensaio; após a aclimação, efetua-se análises com uma maior frequência. É igualmente possível calcular, a partir dos dados no estado estacionário, a percentagem de eliminação do produto químico em estudo da fase líquida ( $R_T$ ) por todos os processos (físicos e biológicos), bem como a proporção removida do sistema ( $R_V$ ).

Cálculos:

- a) No ensaio não biológico, a percentagem ( $R_{VP}$ ) de produto químico em estudo removido do sistema pode calcular-se com base na fórmula:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_P} \cdot 100$$

em que

$R_{VP}$  = remoção do produto químico em estudo por volatilização (%),

$S_{VP}$  = produto químico em estudo recolhido no coletor, expresso em concentração equivalente na fase líquida (mg/l),

$S_P$  = concentração do produto químico em estudo no afluente (mg/l).

- b) No ensaio biológico, a percentagem ( $R_V$ ) de produto químico em estudo removida do sistema pode calcular-se com base na fórmula:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

em que

$R_V$  = remoção do produto químico em estudo por volatilização, no ensaio biológico (%)

$S_V$  = produto químico em estudo recolhido no coletor, no ensaio biológico, expresso em concentração equivalente no afluente líquido (mg/l),

$S_I$  = concentração do produto químico em estudo no afluente (mg/l).

c) No ensaio biológico, a percentagem ( $R_T$ ) de produto químico em estudo removida por todos os processos é dada por:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

em que

$S_E$  = concentração de produto químico em estudo no efluente líquido (mg/l).

d) Assim, a percentagem ( $R_{BA}$ ) removida por biodegradação e adsorção é calculada da seguinte forma:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Deve realizar-se ensaios separados para determinar se o produto químico em estudo é adsorvido; se for o caso, pode efetuar-se uma nova correção.

e) Uma comparação entre a proporção de produto químico em estudo removida nos sistemas de ensaio biológico ( $R_V$ ) e não biológico ( $R_{VP}$ ) indica os efeitos globais do tratamento biológico na emissão do produto para a atmosfera.

*Exemplo:* Benzeno

Tempo de retenção nas lamas = 4 dias

Tempo de retenção nas águas residuais sintéticas = 8 horas

$$S_{IP} = S_I = 150 \text{ mg/l}$$

$$S_{VP} = 150 \text{ mg/l} \quad (S_{EP} = 0)$$

$$S_V = 22,5 \text{ mg/l}$$

$$S_E = 50 \text{ } \mu\text{g/l}$$

Assim,

$$R_{VP} = 100 \%, \quad R_V = 15 \%$$

$$R_T = 100 \% \text{ e } R_{BA} = 85 \%$$

Conclui-se que o benzeno não é adsorvido pelas lamas.

#### REFERÊNCIAS

- (1) Horn J.A., Moyer J.E., Hale J.H. (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.
- (2) Pitter P., Chudoba J. (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.
- (3) Stover E.L., Kincannon D.F. (1983): Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.
- (4) ISO 10634 (1995) Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
- (5) Capítulo C.4 deste anexo: "Determinação da biodegradabilidade 'fácil' ".

## Apêndice 6

**Efeitos do tempo de retenção das lamas (SRT) na capacidade de tratamento dos produtos químicos**

## INTRODUÇÃO

1. O método descrito no texto principal foi concebido para verificar se os produtos químicos sujeitos a ensaio (geralmente aqueles cuja biodegradabilidade inerente é conhecida, mas não a "fácil") podem ser biodegradados nos limites impostos nas estações de tratamento de águas residuais. Os resultados são expressos em termos de percentagem de remoção e percentagem de biodegradação. As condições de funcionamento das unidades de lamas ativadas e a escolha do afluente permitem grandes variações de concentração do produto químico em estudo no efluente. Os ensaios são efetuados apenas com uma concentração nominal de lamas sólidas ou um tempo de retenção nominal (SRT); os caudais de remoção das lamas descritos podem causar variações consideráveis do SRT durante o ensaio, tanto de dia para dia como num determinado dia.
2. Nesta variante (1) (2), o SRT é mantido entre limites muito mais estreitos em cada período de 24 horas (tal como acontece em grande escala), o que resulta numa concentração mais constante nos efluentes. Recomenda-se a utilização de águas residuais domésticas, que proporciona uma percentagem de remoção mais constante e elevada. Além disso, investigam-se os efeitos de uma série de valores de STF; num estudo mais pormenorizado, podem estudar-se os efeitos da variação da temperatura na concentração do efluente.
3. Ainda não há consenso quanto aos modelos cinéticos implicados na biodegradação nas condições de tratamento de águas residuais. O modelo de Monod de crescimento bacteriano e a utilização do substrato foram selecionados (1)(2) para aplicação aos dados recolhidos, uma vez que o método se destinava a ser aplicado apenas a produtos químicos produzidos em grandes quantidades, que produziam concentrações superiores a 1 mg/l nas águas residuais. A validade do modelo simplificado e os pressupostos assumidos foram estabelecidos por recurso a uma série de etoxilatos de etilo com diversos graus de biodegradabilidade primária (2)(3).

*Nota:* Este método alternativo segue de perto o método descrito (C.10-A), apenas diferindo nos aspetos que se indicam de seguida.

## PRINCÍPIO DO MÉTODO

4. Utiliza-se unidades de vasos porosos com lamas ativadas, concebidas para facilitar a remoção quase contínua do meio fluido misto, de forma a permitir um controlo muito preciso do tempo de retenção das lamas (SRT, ou  $\theta_s$ ), de modo não interligado, numa determinada gama de SRT e, eventualmente, numa determinada gama de temperaturas. Em geral, o tempo de retenção é de 2 a 10 dias, a uma temperatura compreendida entre 5 e 20 °C. As águas residuais, de preferência domésticas, e uma solução do produto químico em estudo são colocadas separadamente nas unidades a caudais que proporcionem o tempo de retenção requerido (três a seis horas) e a concentração requerida do produto no afluente. Paralelamente, para fins comparativos, utilizam-se unidades de controlo sem adição do produto químico em estudo.
5. Pode utilizar-se outros tipos de equipamentos, devendo porém fazer-se o possível para assegurar o controlo dos SRT. Por exemplo, no caso de instalações munidas de um decantador, pode ser necessário ter em conta a perda de sólidos através dos efluentes. Além disso, deve tomar-se precauções especiais para evitar erros atribuíveis à variação da quantidade de lamas no decantador.
6. Faz-se funcionar as unidades com cada conjunto selecionado de condições; ao atingir o equilíbrio, medem-se as concentrações estacionárias médias do produto químico em estudo e, eventualmente, o COD nos efluentes, num período de cerca de três semanas. Além de avaliar a percentagem de remoção do produto químico em estudo e, opcionalmente, o COD, determina-se, na forma de gráfico, a relação entre as condições de funcionamento da instalação e a concentração do produto no efluente. A partir do gráfico, pode calcular-se as constantes cinéticas e prever-se as condições de processamento do produto químico em estudo.

## INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

7. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 12 e 13.

## NÍVEIS DE APROVAÇÃO

8. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 14 e 15.

## SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

9. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, ponto 16.

## REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS

10. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 17 e 18.

## DESCRIÇÃO DO MÉTODO

**Dispositivos**

11. O sistema de vasos porosos modificado (apêndice 6.1) constitui uma unidade adequada. Consiste num recipiente interno (ou revestimento) de polipropileno poroso com 3,2 mm de espessura e porosidade aproximada 90 µm, com juntas soldadas topo a topo, o que torna esta unidade mais robusta do que a descrita no ponto 21 do presente capítulo, C.10-A. O revestimento é colocado num recipiente exterior de polietileno impermeável, composto por duas partes, designadamente uma base circular em que se abrem orifícios destinados a receber duas linhas de ar e um tubo para remoção das lamas, e um cilindro superior aparafusado à base, com uma saída posicionada de forma a proporcionar um volume conhecido (3 l) ao recipiente de vasos porosos. Uma das condutas de ar é munida de uma pedra difusora; a outra tem uma extremidade aberta, estando posicionada perpendicularmente à pedra no recipiente. Este sistema produz a agitação necessária para assegurar a mistura completa do conteúdo do vaso, bem como concentrações de oxigénio dissolvido superiores a 2 mg/l.
12. As unidades, em número adequado, são mantidas a temperaturas controladas na gama 5-20 °C ( $\pm 1$  °C), quer por meio de banhos-maria quer mantendo a temperatura da zona a um nível constante. São necessárias bombas para transferir a solução Do produto químico em estudo, bem como as águas residuais decantadas, para os recipientes de arejamento, com o caudal requerido (0-1,0 ml/min e 0-25 ml/min, respetivamente), e uma terceira bomba para remover os resíduos de lamas dos recipientes de arejamento. O necessário caudal muito baixo de resíduos de lamas é obtido por recurso a uma bomba fixada a um caudal mais elevado, funcionando de forma intermitente sob o comando de um temporizador (por exemplo, 10 segundos por minuto, com um caudal de 3 ml/min, produzindo, assim, uma taxa de remoção de 0,5 ml/min).

*Dispositivo de filtração ou centrifugação*

13. Aplica-se o descrito no capítulo C10 A, ponto 23.

*Equipamento de análise*

14. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, ponto 24.

*Água*

15. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 25 e 26.

*Meio orgânico*

16. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, ponto 27.

*Águas residuais sintéticas*

17. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, ponto 28.

*Águas residuais domésticas*

18. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, ponto 29.

*Lamas ativadas*

19. Aplica-se o descrito no capítulo C10 A, ponto 30.

*Soluções-mãe do produto químico em estudo*

20. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 31 e 32.

## PROCEDIMENTO

*Preparação do inóculo*

21. Aplica-se o descrito no capítulo C.10, ponto 34 — utilizar lamas ativadas (cerca de 2,5 g/l).

*Número de unidades de ensaio*

22. Para um ensaio simples, ou seja, para medir a percentagem de eliminação, apenas é necessário um STF; contudo, para obter os dados necessários ao cálculo das constantes cinéticas, deve dispor-se de 4 ou 5 valores de STF. Selecionam-se, em geral, valores compreendidos entre 2 e 10 dias. Na prática, é conveniente realizar em simultâneo um ensaio com 4 ou 5 SRT, a uma dada temperatura, em estudos mais aprofundados, utilizam-se os mesmos SRT, ou,

eventualmente, uma gama diferente de valores, a outras temperaturas na gama 5-20 °C. Para a biodegradação primária (principal utilização), apenas se necessita, em geral, de uma unidade por conjunto de condições. No entanto, para a determinação da biodegradabilidade final, é necessária, para cada conjunto de condições, uma unidade de controlo que processe as águas residuais sem o produto químico em estudo. Caso se suponha que este está presente nas águas residuais utilizadas, é necessário recorrer a unidades de controlo para avaliar a biodegradação primária e efetuar as necessárias correções nos cálculos.

#### *Introdução do meio orgânico e do produto químico em estudo*

23. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 36 a 39; de salientar, contudo, que o produto químico em estudo é adicionado separadamente e que são utilizados vários caudais de remoção de lamas. Controlar e ajustar também frequentemente, se necessário, com uma precisão de 10 %, os caudais dos afluentes, dos efluentes e da remoção de lamas, por exemplo, duas vezes por dia. Se surgirem dificuldades com os métodos analíticos ao utilizar águas residuais domésticas, realizar o ensaio com o efluente sintético, garantindo, porém, que os meios diferentes originam dados cinéticos comparáveis.

#### *Processamento das lamas ativadas*

24. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 40 a 43, controlando, porém, o SRT através da eliminação constante de lamas.

#### *Amostragem e análise*

25. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 44 a 50, determinando obrigatoriamente a concentração do produto químico em estudo e, facultativamente, o COD; não deve utilizar-se a CQO.

### DADOS E RELATÓRIOS

#### **Tratamento dos resultados**

26. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 52 a 54.

#### **Apresentação dos resultados do ensaio**

27. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 56 a 62.

#### **Cálculo das constantes cinéticas**

28. É mais realista exprimir a concentração média do produto químico em estudo no efluente, no estado estacionário, e descrever o modo como varia, nas condições de funcionamento da instalação, do que exprimir a percentagem de biodegradação primária. Para tal, pode recorrer-se à equação (6) do apêndice 6.2, que pode fornecer valores para os parâmetros  $K_S$ ,  $\mu_m$  e  $\vartheta_{SC}$ , tempo crítico de retenção das lamas.

(em alternativa, podem obter-se valores de  $K_S$  e  $\mu_m$  utilizando um programa informático simples que adapte aos valores experimentais obtidos a curva teórica determinada a partir da equação 2 (apêndice 6.2). Embora a solução obtida não seja única, pode obter-se um valor aproximado razoável dos parâmetros  $K_S$  e  $\mu_m$ ).

#### **Variabilidade dos resultados**

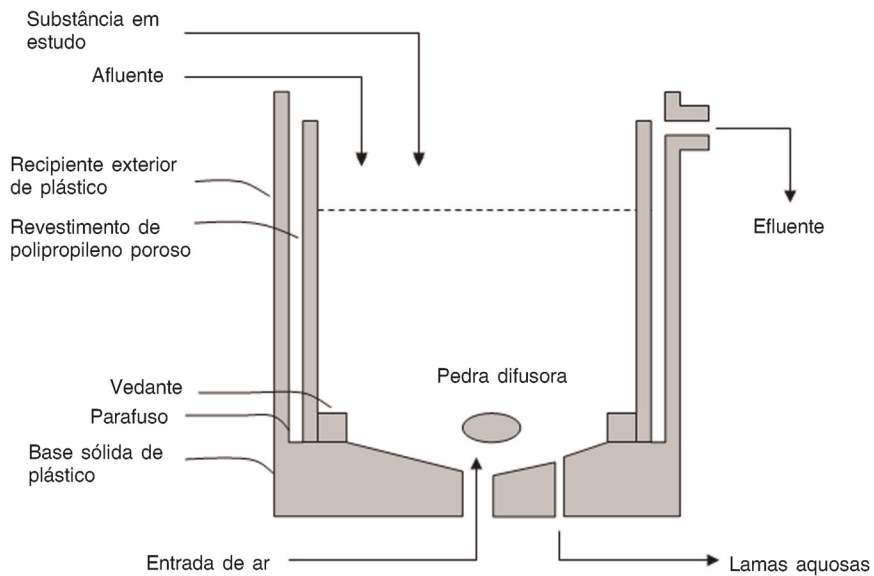
29. Sabe-se pela experiência que cada produto químico produz valores diferentes de parâmetros cinéticos. Pensa-se que as condições de cultivo das lamas, bem como as condições de ensaio utilizadas (cf. ponto 5 e outros ensaios), influenciam de modo considerável os valores obtidos. Um aspeto desta variabilidade foi debatido por Grady *et al.* (4), que sugeriram a utilização dos termos "permanentes" e "intrínsecas" para qualificar duas condições extremas que representam os limites do estado fisiológico de uma cultura durante um ensaio cinético. Se não forem possíveis mudanças de estado durante o ensaio, os valores dos parâmetros cinéticos refletem as condições do ambiente do qual foram extraídos os microrganismos; estes valores são chamados "permanentes". No extremo oposto, se as condições de ensaio forem de molde a permitir o pleno desenvolvimento do sistema de síntese proteica que proporcione a taxa de crescimento máxima, os parâmetros cinéticos obtidos são "intrínsecos" e apenas dependentes da natureza do substrato e dos tipos de bactérias na cultura. A título de orientação, os valores existentes são obtidos mantendo um rácio baixo (por exemplo, 0,025) de concentração do substrato para microrganismos adequados ( $S_0/X_0$ ), surgindo os valores intrínsecos quando o rácio é elevado (por exemplo, não inferior a 20). Em ambos os casos, o valor  $S_0$  deve ser igual ou superior ao valor de  $K_S$  (constante de auto-saturação).
30. A variabilidade, juntamente com outros aspetos da cinética da biodegradação, foi debatida num seminário recente da SETAC (5). Esses estudos, realizados ou projetados, permitirão uma visão mais clara da cinética dos processos nas estações de tratamento de águas residuais, tendo em vista uma melhor interpretação dos dados existentes e propor modelos mais adequados para os futuros métodos de ensaio.

## REFERÊNCIAS:

- (1) Birch R.R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. *XIII Jornada Com. Español Deterg.*: 33-48.
  - (2) Birch R.R. (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. *J.A.O.C.S.*, 61(2): 340-343.
  - (3) Birch R.R. (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 50: 411-422.
  - (4) Grady C.P.L., Smets B.F., Barbeau D.S. (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. *Wat. Res.*, 30 (3): 742-748.
  - (5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop realizado em Port Sunlight, Reino Unido. Eds. Hales S.G., Feitjel T., King H., Fox K., Verstraete W. 4-6 Set. 1996. SETAC- Europe, Bruxelas.
-

## Apêndice 6.1

## Vaso poroso com controlo do SRT





## Apêndice 6.2

## Cálculo das constantes cinéticas

1. Assumindo a aplicabilidade da cinética de Monod e um equilíbrio de massas dos sólidos ativos e do substrato no sistema de lamas ativadas (1), podem obter-se as seguintes expressões para os estados estacionários:

$$\frac{1}{\vartheta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad [1]$$

ou

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \vartheta_s)}{\vartheta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \quad [2]$$

em que

$S_1$  = concentração de substrato no efluente (mg/l)

$K_s$  = constante de meia saturação (concentração à qual  $\mu = \mu_m/2$  (mg/l)

$\mu$  = taxa de crescimento específica ( $d^{-1}$ )

$\mu_m$  = valor máximo de  $\mu_m$  ( $d^{-1}$ )

$K_d$  = taxa de eliminação específica dos sólidos ativos ( $d^{-1}$ )

$\vartheta_s$  = tempo médio de retenção das lamas, SRT (d)

O exame desta equação conduz às seguintes conclusões:

- i) a concentração do efluente é independente da do afluente ( $S_0$ ); por conseguinte, a percentagem de biodegradação varia com a concentração do efluente,  $S_0$ ;
- ii) o único parâmetro de controlo da instalação que afeta a concentração  $S_1$  é o tempo de retenção das lamas,  $\vartheta_s$ ;
- iii) a cada concentração no afluente,  $S_0$ , corresponde um tempo crítico de retenção das lamas, da seguinte forma:

$$\frac{1}{\vartheta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad [3]$$

em que

$\vartheta_{SC}$  = tempo crítico de retenção das lamas, abaixo do qual os microrganismos competentes são eliminados da instalação.

- iv) uma vez que os outros parâmetros da equação (2) estão associados à cinética do crescimento, a temperatura é suscetível de afetar o nível de substrato no efluente e o tempo de permanência crítico das lamas, ou seja, o tempo de retenção das lamas necessário para obter um certo nível de tratamento aumenta à medida que diminui a temperatura.

2. A partir de um equilíbrio de massas de sólidos no sistema de vasos porosos, e partindo do princípio de que a concentração de sólidos no efluente da instalação,  $X_2$ , é reduzido em comparação com a do tanque de arejamento,  $X_1$ , o tempo de retenção das lamas é dado por:

$$\vartheta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \quad [4]$$

e

$$\vartheta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

em que

$V$  = volume do tanque de arejamento (l)

$X_1$  = concentração de sólidos no tanque de arejamento (mg/l)

$X_2$  = concentração de sólidos no efluente (mg/l)

$Q_0$  = caudal do afluente (l/d)

$Q_1$  = caudal dos resíduos de lamas (l/d)

É, pois, possível manter o tempo de retenção das lamas a um determinado valor pré-selecionado através do controlo do caudal dos resíduos de lamas,  $Q_1$ .

#### Conclusões

- O principal objetivo do ensaio consiste em permitir prever a concentração do efluente e, por conseguinte, os níveis do produto químico em estudo nas águas receptoras.
- Representando graficamente  $S_1$  versus  $\vartheta_s$ , pode, por vezes, avaliar-se rapidamente o tempo crítico de retenção das lamas,  $\vartheta_{SC}$  (exemplo: curva 3 da figura 1). Se tal não for possível, pode calcular-se  $\vartheta_{SC}$ , obtendo também valores aproximados de  $\mu_m$  e  $K_S$ , representando  $S_1$ , versus  $S_1 \cdot \vartheta_s$ .

Rearranjando a equação (1), obtém-se

$$\frac{S_1 \cdot \vartheta_s}{1 + \vartheta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [5]$$

Se o valor  $K_d$  for baixo,  $1 + \vartheta_s \cdot K_d \sim 1$  e a equação [5] assume a forma:

$$S_1 \cdot \vartheta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [6]$$

O gráfico deve, pois, ser uma linha reta (figura 2) de declive  $1/\mu_m$  e ordenada na origem  $K_S/\mu_m$ ; além disso,  $\vartheta_s \sim 1/\mu_m$ .

Figura 1

#### Três temperaturas; cinco SRT

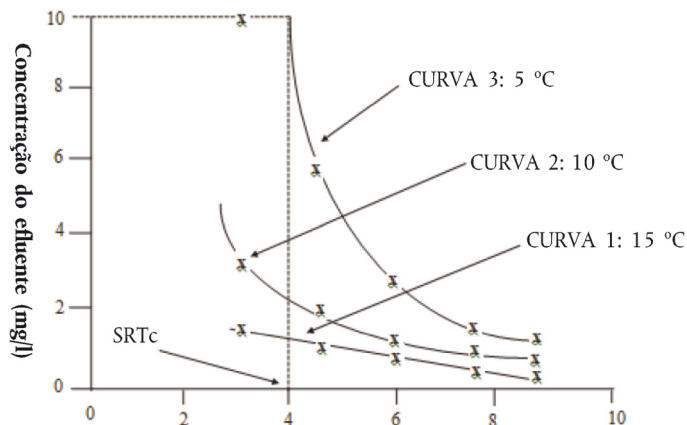
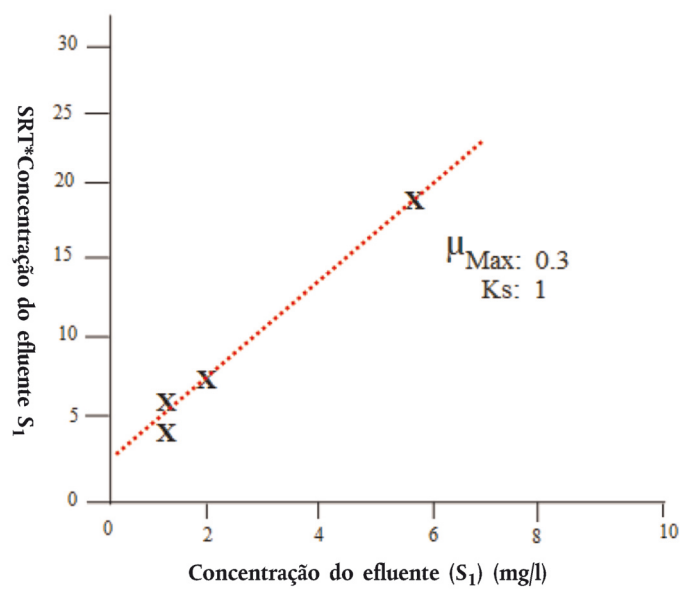


Figura 2

Regressão linear  $SRT \cdot S_1$  versus  $S_1$  ( $T = 5^\circ\text{C}$ )

Glossário:

Concentração do efluente

Curva

## Apêndice 7

## ENSAIO NUMA GAMA BAIXA DE CONCENTRAÇÕES (µg/l)

1. Muitos produtos químicos encontram-se presentes no meio aquático, inclusive nas águas residuais, a muito baixas concentrações (µg/l). Nessas concentrações, não podem, provavelmente, constituir substratos primários para o crescimento bacteriano, mas é maior a probabilidade de se decomporem como substratos secundários, em competição com uma vasta gama de compostos de carbono de ocorrência natural. A decomposição desses produtos não se adapta, pois, ao modelo descrito no apêndice 6. Existem vários modelos suscetíveis de serem aplicados e, nas condições inerentes aos sistemas de tratamento de águas residuais, pode utilizar-se mais de um sistema em simultâneo. É necessário prosseguir a investigação com vista a elucidar esta questão.
2. Entretanto, pode seguir-se o procedimento descrito no texto principal (capítulo C.10-A), mas apenas no respeitante à biodegradabilidade primária, utilizando uma gama adequada de baixas concentrações (< 100 µg/l) e um procedimento analítico validado. A percentagem de biodegradação pode ser calculada (ponto 54 do método de ensaio) tendo em conta os processos abióticos (adsorção, volatilidade etc.). Nyholm e seus colaboradores (1)(2) realizaram um estudo utilizando um ciclo de 4 h num sistema "enchimento-esvaziamento", tendo comunicado a obtenção de constante de pseudo-primeira ordem para cinco produtos químicos adicionados a um efluente sintético (5 a 100 µg/l). No caso da biodegradabilidade final, podem utilizar-se substâncias marcadas com <sup>14</sup>C. A descrição deste procedimento excede o âmbito do presente método de ensaio, dado não existirem ainda procedimentos aprovados, embora tenha sido proposto um método (ISO 14592 (3)) que contém orientações para a utilização de produtos químicos marcadas com <sup>14</sup>C.

**Ensaio SCAS**

3. Posteriormente, foi proposto um ensaio mais simples, em duas fases (4)(5)(6); o método semi-contínuo das lammas ativadas (*semi-continuous activated sludge* - SCAS) é seguido de ensaios cinéticos curtos com amostras colhidas nas unidades SCAS. Contrariamente ao método de ensaio original C.12, o sistema SCAS funciona com caudais conhecidos de remoção de lammas e utiliza águas residuais sintéticas OCDE ou águas residuais domésticas. Em virtude da variabilidade do pH e da reduzida decantabilidade das lammas, as águas residuais sintéticas são modificadas por adição de tampão de fosfatos, extrato de levedura, cloreto de ferro (III) e quantidades vestigiais de sais, sendo a sua CQO aumentada para cerca de 750 mg/l através do reforço da concentração de peptona e extrato de carne. As unidades funcionam num ciclo de 24 h: arejamento durante 23 h, remoção das lammas, decantação, remoção do sobrenadante (efluente) seguida de adição das águas residuais sintéticas com o produto químico em estudo, até perfazer 100 µg/l, (aproximadamente a mesma concentração utilizada no ensaio curto). Uma vez por semana, 10 % das lammas totais substituem-se por lammas recentes, para manter o equilíbrio da população microbiana.
4. Determinam-se as concentrações iniciais e finais do produto químico em estudo no início e no final da fase de arejamento, prosseguindo-se o ensaio até se alcançar uma remoção constante do produto químico, o que pode levar de uma semana a vários meses.

**Ensaio curto**

5. Efetua-se um ensaio curto (p.ex., oito horas) para determinar a constante cinética de pseudo-primeira ordem para a eliminação do produto químico em estudo em lammas ativadas com origens e históricos conhecidos mas diferentes. São colhidas, nomeadamente, amostras de lammas dos reatores SCAS, no termo de um período de arejamento (em que a concentração de substrato orgânico é baixa), num ensaio de aclimação (pontos 3 e 4). Podem também recolher-se lammas de uma unidade SCAS paralela não exposta ao produto químico em estudo, para fins comparativos. Procedem-se ao arejamento de misturas de lammas e do produto químico em estudo, adicionado em duas ou mais concentrações na gama 1-50 µg/l, sem águas residuais sintéticas ou outro substrato orgânico. O produto químico em estudo remanescente na solução é determinado a intervalos regulares (p.ex. de hora a hora), consoante a sua degradabilidade, por um período não superior a 24 h. As amostras são centrifugadas antes de sujeitas a análise adequada.

**Cálculos**

6. Os dados das unidades SCAS são utilizados para calcular a percentagem de remoção do produto químico em estudo (ponto 54). Por outro lado, a constante média de velocidade,  $K_1$ , (corrigida para ter em conta a concentração de sólidos em suspensão) pode ser calculada do seguinte modo:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g \text{ h})$$

em que

t = tempo de arejamento (23 h)

$C_e$  = concentração no final do período de arejamento (µg/l)

$C_i$  = concentração no início do arejamento (µg/l)

SS = concentração de sólidos nas lammas ativadas (g/l)

7. No ensaio curto, o logaritmo da concentração percentual remanescente é representado em função do tempo; o declive da parte inicial (10-50 % de degradação) da curva é equivalente a  $K_1$ , constante de pseudo-primeira ordem. Esta é corrigida para ter em conta a concentração de sólidos nas lammas dividindo o declive por esta última concentração. Os resultados comunicados devem incluir pormenores relativos às concentrações iniciais de produto químico em estudo e de sólidos em suspensão, ao tempo de retenção das lammas, à origem e à carga destas e, se pertinente, à exposição prévia ao produto químico em estudo.

### Variabilidade dos resultados

8. A variabilidade, juntamente com outros aspetos da cinética da biodegradação, foi debatida num seminário recente da SETAC (7). Esses estudos, realizados ou projetados, permitirão uma visão mais clara da cinética dos processos nas estações de tratamento de águas residuais, tendo em vista uma melhor interpretação dos dados existentes e propor modelos mais adequados para os futuros métodos de ensaio.

### REFERÊNCIAS

- (1) Nyholm N., Jacobsen B.N., Pedersen B.M., Poulsen O., Dambourg A., Schultz B. (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. *Biodegradability. Wat. Res.* 26: 339-353.
- (2) Jacobsen B.N., Nyholm N., Pedersen B.M., Poulsen O., Ostfeldt P. (1993): Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. *Wat. Res.* 27: 1505-1510.
- (3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.
- (4) Nyholm N., Ingerslev F., Berg U.T., Pedersen J.P., Frimer-Larsen H. (1996): Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations *Chemosphere* 33 (5): 851-864.
- (5) Berg U.T., Nyholm N. (1996): Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. *Chemosphere* 33 (4): 711-735.
- (6) Danish Environmental Protection Agency: (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, U.T. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.
- (7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997): *Workshop* realizado em Port Sunlight, Reino Unido. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K., Verstraete, W. 4-6 Set. 1996. SETAC- Europe, Bruxelas.

---

### C.10-B: Biofilmes

#### INTRODUÇÃO

1. Em geral, os ensaios de simulação aplicam-se a produtos químicos não aprovados num ensaio de rastreio da biodegradabilidade imediata [capítulo C.4, A a F, do presente anexo (9)], mas aprovados num ensaio de biodegradabilidade inerente. Exceionalmente, os ensaios de simulação podem também aplicar-se a qualquer produto químico em relação ao qual sejam necessárias mais informações, em especial produtos químicos produzidas em grandes quantidades, para o que se recorre, em geral, a um ensaio de lamas ativadas (C.10-A). Em alguns casos, contudo, são necessárias informações específicas sobre o comportamento de um produto químico com a aplicação de métodos de tratamento de águas residuais com recurso a biofilmes, nomeadamente filtros percoladores ou biológicos, contratores rotativos biológicos e leitos fluidizados. Para tal, foram desenvolvidos vários dispositivos.
2. Gerike *et al.* (1) utilizaram filtros biológicos de grandes dimensões, à escala-piloto, em modo interligado. Estes filtros ocupam muito espaço e necessitam de volumes relativamente elevados de águas residuais, sintéticas ou não. Truesdale *et al.* (2) descreveram um sistema que utiliza filtros mais pequenos (6 pés x 6 polegadas de diâmetro), alimentados com águas residuais naturais isentas de tensoativos, mas que requerem, mesmo assim, volumes elevados. Podem ser necessárias 14 semanas para a "maturação" de um bifilme e 4 a 8 semanas adicionais, após a primeira introdução do tensoativo em estudo, para que se registre aclimação.
3. Baumann *et al.* (3) desenvolveram um filtro muito mais pequeno de poliéster "aveludado" previamente embebido em lama ativada (suporte inerte). O produto químico em estudo constitui a única fonte de carbono; a biodegradabilidade é avaliada através de determinações do carbono orgânico dissolvido (COD) no afluente e no efluente, bem como da quantidade de CO<sub>2</sub> nos gases libertados.
4. Gloyna *et al.* (4) utilizaram uma abordagem radicalmente diferente, tendo inventado o reator tubular rotativo. Procedeu-se à cultura de um biofilme na superfície interna do tubo rotativo, mediante passagem de afluente introduzido no topo do tubo, inclinado num ângulo ligeiro relativamente à horizontal. O reator foi utilizado para estudar a biodegradabilidade dos tensoativos (5), bem como para investigar a espessura ótima do biofilme e a difusão através do mesmo (6). Posteriormente, estes autores introduziram aperfeiçoamentos no reator, alterando-o, nomeadamente para poderem determinar o CO<sub>2</sub> nos gases libertados.

5. O reator tubular rotativo foi desenvolvido pelo *Standing Committee of Analysts* (Reino Unido) como método-padrão para avaliar a biodegradabilidade de produtos químicos (7) e a tratabilidade e toxicidade das águas residuais (8). O método que se descreve tem como vantagens a simplicidade, a compactidade, a reprodutibilidade e a necessidade de quantidades relativamente baixas de meio orgânico.

#### PRINCÍPIO DO MÉTODO

6. As águas residuais, sintéticas ou domésticas, e o produto químico em estudo, simples ou em mistura, entram em contacto com a superfície interna de um tubo rotativo ligeiramente inclinado. Assiste-se à formação, na superfície interna, de uma camada de microrganismos semelhante à que se observa nos biofiltros. As condições de funcionamento do reator são escolhidas de forma a proporcionarem uma eliminação adequada da matéria orgânica e, se necessário, a oxidação do ião amónio.
7. Recolhe-se o efluente do tubo, que é decantado e/ou filtrado antes da determinação do COD e/ou do produto químico em estudo por um método específico. As unidades de controlo que não utilizam o produto químico em estudo funcionam em paralelo, nas mesmas condições, para fins comparativos. Considera-se que a diferença entre as concentrações de COD nos efluentes das unidades de ensaio e de controlo é devida ao produto químico em estudo e aos seus metabolitos orgânicos. Esta diferença é comparada com a concentração do produto químico em estudo adicionado (expressa em COD), para o cálculo da eliminação deste.
8. Em princípio, é possível distinguir-se a biodegradação da bioadsorção através de um exame cuidadoso da curva eliminação *versus* tempo. Em geral, pode obter-se a confirmação por recurso a um ensaio de biodegradação rápida (consumo de oxigénio ou produção de dióxido de carbono), utilizando um inóculo aclimatado colhido, no final do ensaio, nos reatores nos quais foi adicionado o produto químico em estudo.

#### INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

9. A pureza, a solubilidade em água, a volatilidade e as características de adsorção do produto químico devem ser conhecidas, a fim de permitir a interpretação correta dos resultados.
10. Em geral, os produtos químicos voláteis e pouco solúveis não podem ser testados, salvo se forem tomadas precauções especiais (ver o capítulo C.10-A, apêndice 5). A estrutura química ou, pelo menos, a fórmula empírica, devem também ser conhecidas para o cálculo dos valores teóricos e/ou a confirmação dos valores medidos dos parâmetros, como, por exemplo, a carência teórica de oxigénio (CTeO) e o COD.
11. O facto de se dispor de informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo para os microrganismos (ver o capítulo C.10-A, apêndice 4) pode ser útil para seleccionar concentrações de ensaio adequadas e pode ser essencial para a interpretação correta de valores baixos de biodegradação.

#### NÍVEIS-LIMITE

12. No passado, os tensoativos tinham de apresentar uma biodegradação primária de, pelo menos, 80 %, para que os produtos pudessem ser comercializados. Para percentagens inferiores, pode recorrer-se ao presente ensaio de simulação (confirmação) e o tensoativo só pode ser comercializado se remover mais de 90 % do produto químico em causa. Com a generalidade dos produtos químicos, não se coloca a questão de exceder ou de não atingir a percentagem de remoção obtida, que pode ser utilizada no cálculo aproximado da concentração ambiental provável a utilizar na avaliação dos riscos dos produtos químicos. Numa série de estudos de produtos químicos puros, observou-se uma percentagem de remoção de COD superior a 90 % em mais de três quartos das amostras e superior a 80 % em mais de 90 % das produtos que revelaram um grau significativo de biodegradabilidade.

#### SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

13. A fim de garantir a execução correta do processo experimental, é importante submeter a ensaios ocasionais substâncias de referência de comportamento conhecido. Essas substâncias incluem o ácido adípico, o 2-fenilfenol, o 1-naftol, o ácido difénico e o ácido 1-naftóico.

#### REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS

14. Um laboratório no Reino Unido obteve os valores de 3,5 % para o desvio-padrão relativo intra-ensaios e de 5 % para o mesmo parâmetro inter-ensaios (7).

#### DESCRIÇÃO DO MÉTODO

##### Equipamento

##### *Reatores tubulares rotativos*

15. O dispositivo (ver figuras 1 e 2 no apêndice 8) é constituído por um conjunto de tubos acrílicos, cada um dos quais com 30,5 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro interno, suportados por rodas revestidas com borracha num suporte metálico. Cada tubo tem um entalhe exterior, com cerca de 0,5 cm de profundidade, para encaixe

nas rodas; a superfície interna é endurecida com um fio de lã grosseira e existe um rebordo com 0,5 cm de profundidade na extremidade superior (alimentação) para reter o líquido. Os tubos estão inclinados num ângulo de aproximadamente um grau em relação à horizontal, de forma a proporcionar o tempo de contacto necessário quando o meio de ensaio é introduzido num tubo limpo. As rodas revestidas com borracha rodam por ação de um motor de velocidade lenta ajustável. A temperatura dos tubos é controlada por instalação num compartimento com temperatura constante.

16. Introduzindo cada reator tubular num tubo ligeiramente maior, tapado, e assegurando a impermeabilidade gasosa das vedações, é possível recolher numa solução alcalina o CO<sub>2</sub> libertado, para posterior determinação (6).
17. Durante 24 horas, introduz-se em cada tubo meio orgânico, se for caso disso com o produto químico em estudo, armazenado num recipiente de 20 l (a) (ver a figura 2). Se necessário, a solução do produto químico em estudo pode ser introduzida separadamente. Cada recipiente de armazenagem apresenta, junto do fundo, um orifício do qual sai um tubo de um material adequado (por exemplo, de borracha de silicone), que, passando por uma bomba peristáltica (b), se liga a um tubo adutor de vidro ou de um material acrílico, o qual se liga 2-4 cm acima da extremidade mais elevada (de alimentação) do tubo inclinado (C). O efluente sai pela extremidade inferior do tubo inclinado, sendo recolhido noutra recipiente de armazenagem (D). É decantado ou filtrado antes da análise.

#### *Dispositivo de filtração-centrifugação*

18. Dispositivo de filtração das amostras com filtros de membrana de porosidade adequada (diâmetro nominal da abertura: 0,45 m), que adsorva produtos químicos orgânicos solúveis ou liberte uma quantidade mínima de carbono orgânico. Caso se utilizem filtros que libertem carbono orgânico, lavá-los cuidadosamente com água quente, para eliminar o carbono orgânico lixiviável. Em alternativa, pode utilizar-se uma centrifugadora que produza 40 000 m/s<sup>2</sup>.
19. Equipamento analítico para a determinação dos seguintes parâmetros:

- COD/carbono orgânico total (COT) ou carência química de oxigénio (CQO),
- produto químico específico (por HPLC, cromatografia em fase gasosa, etc.), se necessário,
- pH, temperatura, acidez, alcalinidade,
- amónio, nitritos e nitratos, se os ensaios forem executados em condições de nitrificação.

#### *Água*

20. Água da rede de abastecimento, com menos de 3 mg/l de COD.
21. Água destilada ou desionizada, com menos de 2 mg/l de COD.

#### *Meio orgânico*

22. Podem ser utilizadas como meio orgânico águas residuais sintéticas, águas residuais domésticas ou uma combinação de ambas. Foi demonstrado que a utilização de águas residuais domésticas simples origina com frequência uma maior percentagem de remoção de COD em unidades de lamas ativadas, permitindo mesmo a biodegradação de alguns produtos químicos que não sofrem biodegradação quando se utiliza o efluente sintético OCDE. Recomenda-se, pois, a utilização de águas residuais domésticas. Determinar a concentração de COD (ou a CQO) de cada novo lote de meio orgânico. Deve conhecer-se a acidez ou a alcalinidade deste. Se a acidez ou a alcalinidade do meio orgânico for baixa, pode ser necessário adicionar-lhe um tampão adequado (hidrogenocarbonato de sódio ou hidrogenofosfato de potássio), para manter o pH no reator a cerca de 7,5 ± 0,5, durante o ensaio. A quantidade de solução-tampão e o momento em que é adicionada devem ser decididos caso a caso.

#### *Águas residuais sintéticas*

23. Dissolver, por litro de água da torneira: 160 mg de peptona; 110 mg de extrato de carne; 30 mg de ureia; 28 mg de hidrogenofosfato dipotássico anidro (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>); 7 mg de cloreto de sódio (NaCl); 4 mg de cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O); 2 mg de sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O). O efluente sintético OCDE constitui um exemplo e proporciona uma concentração média de COD no afluente de cerca de 100 mg/l. Em alternativa, podem utilizar-se composições mais próximas das das águas residuais em estudo, com uma concentração idêntica de COD. O efluente sintético, numa forma concentrada, pode ter por base água destilada, e ser armazenado a cerca de 1 °C durante uma semana, no máximo. Se necessário, diluir com água da rede de abastecimento (embora este meio não seja satisfatório — por exemplo, a concentração de azoto é muito elevada e o teor de carbono relativamente baixo —, não foram sugeridas alternativas melhores, exceto a adição de mais fosfato, no tampão, e de uma quantidade suplementar de peptona).

*Águas residuais domésticas*

24. Utilizar águas residuais recentemente decantadas, recolhidas diariamente numa instalação de tratamento que processe predominantemente esgotos domésticos. A amostra deve ser recolhida da conduta de alimentação do tanque de decantação primária, ou da conduta de alimentação da instalação de lamas ativadas, e ter a menor quantidade possível de partículas grosseiras. As águas residuais podem ser utilizadas após terem sido armazenadas durante vários dias a cerca de 4 °C, caso apresentem provas de que o COD (ou a CQO) não baixou significativamente (ou seja, mais de 20 %) durante a armazenagem. A fim de limitar perturbações do sistema, o COD (ou a CQO) de cada novo lote deve ser ajustado, antes da utilização, para um valor constante, por exemplo, através de diluição com água da rede de abastecimento.

*Lubrificante*

25. Para a lubrificação dos rolos da bomba peristáltica, podem utilizar-se glicerol ou azeite; ambos são adequados para utilização com tubos de borracha de silicone.

*Soluções-mãe do produto químico em estudo*

26. Se a solubilidade dos produtos químicos for adequada, preparar soluções-mãe de reserva de concentrações adequadas (por exemplo, 1 a 5 g/l) em água desionizada, ou na fração mineral do efluente sintético. No caso de produtos químicos insolúveis, ver o apêndice 5 do capítulo C.10-A. Este método não é aplicável a produtos químicos voláteis sem alterações dos reatores tubulares (ponto 16). Determinar o COD e o COT da solução-mãe, repetindo as medições para cada novo lote. Se a diferença entre o COD e o COT for superior a 20 %, verificar a solubilidade em água do produto químico em estudo. Comparar com o valor nominal o COD ou a concentração do mesmo produto determinados por análise específica da solução-mãe, de forma a averiguar se a recuperação é suficiente (em geral, deve ser superior a 90 %). Verificar, em especial no caso das dispersões, se o COD pode ou não ser utilizado como parâmetro analítico, ou se é necessário utilizar uma técnica analítica específica para o produto químico em causa. No caso das dispersões, é necessário proceder à centrifugação das amostras. Para cada novo lote, determinar o COD, a CQO ou o produto químico em estudo por meio de uma análise específica.
27. Determinar o pH da solução-mãe. A ocorrência de valores extremos indica que a adição do produto químico pode influenciar o pH das lamas ativadas no sistema de ensaio. Neste caso, neutralizar a solução de reserva com pequenas quantidades de ácido ou de base, de forma a obter um pH de  $7,0 \pm 0,5$ , evitando, contudo, a precipitação do produto químico em estudo.

## PROCEDIMENTO

*Preparação do meio orgânico para determinação*

28. Assegurar que os recipientes do afluente e do efluente, bem como a conduta entre o primeiro e o segundo, são bem limpos, de forma a eliminar qualquer proliferação de flora microbiana antes do ensaio e durante o mesmo.
29. Preparar o efluente sintético (ponto 23) diariamente, a partir dos sólidos ou da solução-mãe concentrada, por diluição adequada com água da rede de abastecimento. Medir, numa proveta, a quantidade necessária e adicionar a um recipiente limpo destinado a receber o afluente. Se necessário, juntar também a quantidade necessária de solução-mãe do produto químico em estudo e da substância de referência ao efluente sintético, antes de efetuar a diluição. Se for mais prático, ou necessário para evitar perdas do produto químico em estudo, preparar separadamente uma solução diluída desta em estudo num recipiente específico e aduzi-la aos tubos inclinados através de uma bomba doseadora.
30. Em alternativa (e de preferência), utilizar águas residuais domésticas decantadas (ponto 24) recolhidas diariamente, se possível.

*Funcionamento dos reatores tubulares rotativos*

31. Para a determinação de um produto químico em estudo, são necessários dois reatores tubulares idênticos, montados num compartimento a temperatura constante (em geral,  $22 \pm 2$  °C).
32. Ajustar as bombas peristálticas para um caudal de  $250 \pm 25$  ml/h do meio orgânico (sem o produto químico em estudo) para os tubos inclinados, que se fazem rodar a  $18 \pm 2$  rpm. Lubrificar (ponto 25) os tubos de bombagem no início, bem como, periodicamente, ao longo do ensaio, de modo a assegurar o seu bom funcionamento e prolongar a sua vida útil.
33. Ajustar o ângulo de inclinação dos tubos relativamente à horizontal, de forma a obter um tempo de permanência adequado das matérias nos tubos limpos de  $125 \pm 12,5$ . Estimar o tempo de retenção, adicionando à matéria-prima um marcador não biológico (p.ex. NaCl ou um corante inerte); o tempo necessário para atingir a concentração máxima no efluente é considerado o tempo médio de retenção (se estiver presente uma quantidade máxima de filme, o tempo de retenção pode aumentar até cerca de 30 min).
34. Os referidos caudais, velocidades e tempos são aqueles que se verificou conduzirem a taxas de eliminação adequadas (> 80 %) de COD ou CQO e à produção de efluentes nitrificados. Se a taxa de eliminação for insuficiente, ou se pretender simular o desempenho de uma determinada estação de tratamento, o caudal deve ser alterado. Neste caso, ajustar o caudal de adição do meio orgânico até o desempenho do reator ser equivalente ao da estação de tratamento.



*Inoculação*

35. Se forem utilizadas águas residuais sintéticas, a inoculação proporcionada pelo ar ambiente pode ser bastante para iniciar a proliferação dos microrganismos; se tal não for o caso, adicionar 1 ml/l de águas residuais decantadas à fonte de alimentação, durante 3 dias.

*Medições*

36. Verificar regularmente se os caudais e as velocidades de rotação se encontram dentro dos limites requeridos. Determinar também o pH do efluente, em especial se for previsível a ocorrência de nitrificação.

*Amostragem e análise*

37. O método, os padrões e a frequência da amostragem são escolhidos de acordo com o objetivo do ensaio. Colher, por exemplo, amostras pontuais do afluente e do efluente, ou colher amostras durante um período mais longo, por exemplo, 3-6 h. No primeiro período (sem o produto químico em estudo), colher amostras duas vezes por semana. Filtrar as amostras com membranas ou centrifugar a cerca de 40 000 m/s<sup>2</sup> durante cerca de 15 minutos (ponto 18). Pode ser necessário decantar as amostras e/ou filtrá-las com um filtro grosseiro antes da filtração com membrana. Determinar o COD, ou a CQO, pelo menos em duplicado, bem como, se necessário, a CBO, o amónio e os nitritos/nitratos.
38. As análises devem ser efetuadas o mais rapidamente possível após a colheita e a preparação das amostras. Se for necessário adiar a realização das análises, armazenar as amostras a cerca de 4 °C, na obscuridade, em garrafas hermeticamente fechadas. Se as amostras tiverem de ser armazenadas por um período superior a 48 horas, conservá-las por congelamento, acidificação ou por adição de uma substância tóxica, por exemplo, 20 ml/l de solução a 10 g/l de cloreto de mercúrio (II). Assegurar que a técnica de conservação não influencia os resultados da análise.

*Período de desenvolvimento*

39. Neste período, a superfície do biofilme aumenta até atingir uma espessura ótima, o que leva, geralmente, cerca de 2 semanas, não devendo exceder seis semanas. A eliminação de COD ou de CQO (ponto 44) aumenta até atingir um valor estacionário. Quando tiver sido atingida a fase de patamar, registando-se em valor equivalente em ambos os tubos, seleciona-se um destes como testemunha para o resto do ensaio, durante o qual o seu desempenho deverá permanecer constante.

*Introdução do produto químico em estudo*

40. Adicionar ao outro reator, nesta fase, o produto químico em estudo na concentração requerida, geralmente da ordem de 10-20 mg C/l. O reator de controlo continua a processar apenas o meio orgânico.

*Período de aclimação*

41. Continuar a realizar duas vezes por semana a análise do COD ou da CQO; caso se pretenda avaliar a biodegradabilidade primária, medir também a concentração do produto químico em estudo através de um método de análise específico. Prever de uma a seis semanas (ou, em condições especiais, um período mais longo) para a aclimação, na sequência da introdução do produto químico em estudo. Quando a percentagem de remoção (pontos 43-45) atingir um valor máximo, obter 12-15 valores válidos na fase de patamar durante cerca de três semanas, para avaliação da percentagem de remoção média. Considera-se o ensaio concluído quando for obtido um nível de eliminação suficientemente elevado. A duração do ensaio não deve, em geral, exceder 12 semanas após a adição do produto químico em estudo.

*Eliminação de crostas do filme*

42. A eliminação súbita de grandes quantidades de filme em excesso dos tubos (crostas) ocorre a intervalos relativamente regulares. Para garantir que a comparabilidade dos resultados não é afetada, os ensaios devem abranger, pelo menos, dois ciclos completos de cultura e eliminação de crostas.

**DADOS E RELATÓRIOS****Tratamento dos resultados**

43. Calcular a percentagem de remoção do produto químico em estudo, em termos de COD ou de CQO, para cada avaliação programada, por recurso à equação:

$$D_t = 100 [C_s - (E - E_0)]/C_s \%$$

em que

$D_t$  = % de eliminação do COD ou da CQO no instante  $t$

$C_s$  = concentração de DOC (ou COD) no afluente devida ao produto químico em estudo, estimada, de preferência, a partir da concentração, em mg/l, da solução-mãe e do volume desta adicionado;

$E$  = valor medido de COD ou CQO no efluente em estudo, no instante  $t$  (mg/l)

$E_0$  = valor medido de COD ou CQO no efluente em estudo, no instante  $t$  (mg/l)

Repetir o cálculo para a substância de referência, se tiver sido utilizada.

#### Desempenho do reator-testemunha

44. O grau de eliminação ( $D_B$ ) de COD ou de CQO do meio orgânico da unidade de controlo é uma informação útil para avaliar a atividade de biodegradação do biofilme durante o ensaio. Calcular a percentagem de eliminação por recurso à equação:

$$D_B = 100 (1 - E_0/C_m) \%$$

em que

$C_m$  = COD ou CQO do meio orgânico no afluente de controlo (mg/l)

45. Calcular a remoção ( $D_{ST}$ ) do produto químico em estudo, se determinada por um método analítico específico, em cada instante, com base na equação:

$$D_{ST} = 100 (1 - S_e/S_i) \%$$

em que

$S_i$  = concentração medida ou (de preferência) estimada do produto químico em estudo no afluente (mg/l)

$S_e$  = concentração medida ou estimada do produto químico em estudo no efluente, no instante  $t$  (mg/l)

Se o método de análise conduzir a um valor positivo nas lamas inalteradas, equivalente a  $S_c$  mg/l, calcular a percentagem de eliminação ( $D_{SC}$ ) com base na seguinte equação:

$$D_{SC} = 100 (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c) \%$$

#### Apresentação dos resultados do ensaio

46. Traçar o gráfico da percentagem de eliminação,  $D_t$  (ou  $D_{SC}$ ) e  $D_{ST}$ , se for o caso, em função do tempo (ver o capítulo C.10-A, apêndice 2). Considerar a média (arredondada ao número inteiro mais próximo) e o desvio-padrão dos valores dos 12-15 valores de  $D_T$  (e de  $D_{ST}$ , se disponíveis) obtidos na fase de patamar como a percentagem de remoção do produto químico em estudo. A forma da curva de eliminação permite tirar algumas conclusões quanto aos processos de remoção.

#### Adsorção

47. Caso se observe uma elevada remoção de COD do produto químico em estudo no início do ensaio, o produto em causa é, provavelmente, removido por adsorção no biofilme. Esta suposição pode ser comprovada determinando a quantidade de produto adsorvido nos sólidos removidos do filme. Não é comum que a eliminação do COD das substâncias adsorvíveis permaneça elevada ao longo do ensaio; em geral, observa-se um elevado grau de eliminação no início, que baixa progressivamente para um valor de equilíbrio. Contudo, se a substância em estudo adsorvida tiver causado a aclimação da flora microbiana, a eliminação do seu COD poderá aumentar posteriormente, estabilizando-se em valores elevados.

#### Fase de latência

48. Muitos produtos químicos em estudo passam por uma fase de latência, antes de ocorrer a biodegradação completa, nomeadamente nos ensaios estáticos de rastreio. Na fase de latência, ocorre a aclimação ou adaptação das bactérias responsáveis pela degradação, não se observando praticamente qualquer remoção do produto; a proliferação das bactérias inicia-se em seguida. Esta fase termina, considerando-se que se inicia a fase de degradação, quando for removida cerca de 10 % da quantidade inicial de produto químico em estudo (após a adsorção, caso ocorra). Em geral, a fase de latência é muito variável e pouco reprodutível.

#### Fase de patamar

49. A fase de patamar da curva de eliminação de um ensaio contínuo é definida como a fase em que ocorre a degradação máxima. Deve durar, pelo menos, 3 semanas, durante as quais se devem determinar cerca de 12-15 valores válidos.

**Grau de remoção médio do produto químico em estudo**

50. Calcular o valor médio a partir dos valores de eliminação ( $D_t$  e  $D_{st}$ , se disponível) obtidos para o produto químico em estudo na fase de patamar. O grau de remoção do produto químico em estudo é arredondado ao número inteiro mais próximo (1 %). Recomenda-se também o cálculo do intervalo de confiança de 95 % do valor médio. Calcular do mesmo modo o grau médio ( $D_B$ ) de eliminação do meio orgânico no recipiente de controlo.

**Indicação da biodegradação**

51. Se o produto químico em estudo não for adsorvido de forma significativa pelo biofilme e a curva de eliminação tiver a forma característica de uma curva de biodegradação com fases de latência, degradação e patamar (pontos 48 e 49), a eliminação determinada pode ser atribuída com segurança à biodegradação. Se ocorrer uma elevada remoção inicial, o ensaio de simulação não permite distinguir os processos de eliminação biológicos dos abióticos. Nesses casos, e noutros casos em que existam dúvidas quanto a biodegradação (por exemplo, se ocorrer separação), analisar o produto químico em estudo adsorvido em amostras do filme ou efetuar mais ensaios estáticos de rastreio da biodegradabilidade com base em parâmetros que comprovem claramente os processos biológicos. Esses ensaios devem consistir em métodos baseados no consumo de oxigénio (capítulo C.4 do presente anexo D, E e F) (9) ou num teste que meça a produção de  $CO_2$  (capítulo C.4-C do presente anexo, ou o método *headspace*) (10); utilizar como inóculo biofilme pré-exposto proveniente do reator adequado.
52. Se tiverem sido determinadas a remoção do COD e a eliminação de substâncias específicas, a ocorrência de diferenças significativas entre as percentagens (primeiro valor superior ao segundo) indicam a presença nos efluentes de substâncias orgânicas intermediárias cuja degradação pode ser mais difícil. Estas substâncias devem ser objeto de investigação.

**Validade dos resultados**

53. Considerar o ensaio válido se o grau de eliminação do COD (ou de CQO) ( $D_B$ ) nas unidades de controlo for superior a 80 % após 2 semanas de funcionamento sem se observarem ocorrências relevantes.
54. Se a substância de referência utilizada apresentar uma biodegradabilidade "fácil", o grau de biodegradação deve ser > 90 % e a diferença entre os duplicados não deve exceder 5 %. Caso estes dois critérios não sejam satisfeitos, rever os procedimentos experimentais e/ou utilizar águas residuais domésticas de outra origem.
55. Do mesmo modo, as diferenças entre os valores de biodegradação das unidades em duplicado (se utilizadas) que processem um produto químico em estudo não devem divergir em mais de 5 %. Se este critério não for respeitado, mas a eliminação permanecer elevada, prosseguir a análise por um período de mais três semanas. Se a eliminação for baixa, investigar os efeitos inibidores do produto químico em estudo, caso não sejam conhecidos, e repetir o ensaio com uma concentração inferior do produto, se possível.

**Relatório do ensaio**

56. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

*Produto químico em estudo:*

- dados de identificação,
- natureza física e, quando pertinente, propriedades físico-químicas.

*Condições de ensaio:*

- quaisquer alterações ao sistema de ensaio, especialmente se forem utilizadas frações insolúveis ou voláteis,
- tipo de meio orgânico,
- proporção e natureza das eventuais águas residuais provenientes de indústrias, se conhecidas,
- método de inoculação,
- solução-mãe do produto químico em estudo — COD (carbono orgânico dissolvido) e COT (carbono orgânico total); forma de preparação, caso se trate de uma suspensão; concentração(ões) de ensaio utilizada(s), justificando eventuais desvios em relação à gama 10-20 mg/l de COD; método de adição; data da primeira adição; quaisquer alterações da concentração,

- tempo médio de retenção hidráulica (sem proliferação); velocidade de rotação do tubo; ângulo de inclinação aproximado, se possível,
- pormenores sobre formação de crostas; tempo e intensidade,
- temperatura, ou gama de temperaturas, de ensaio,
- técnicas de análise utilizadas.

*Resultados do ensaio:*

- todos os valores medidos (COD, CQO, análises específicas, pH, temperatura, substâncias azotadas, se for caso disso),
- todos os valores calculados dos parâmetros  $D_t$  (ou  $D_{t0}$ ),  $D_B$ ,  $D_{St}$ , na forma de quadro e a partir das curvas de eliminação,
- informações sobre as fases de latência e de patamar, a duração do ensaio, o grau de eliminação do produto químico em estudo, da substância de referência (se utilizada) e do meio orgânico na unidade de controlo, juntamente com dados estatísticos e conclusões sobre a biodegradabilidade e a validade do ensaio,
- discussão dos resultados.

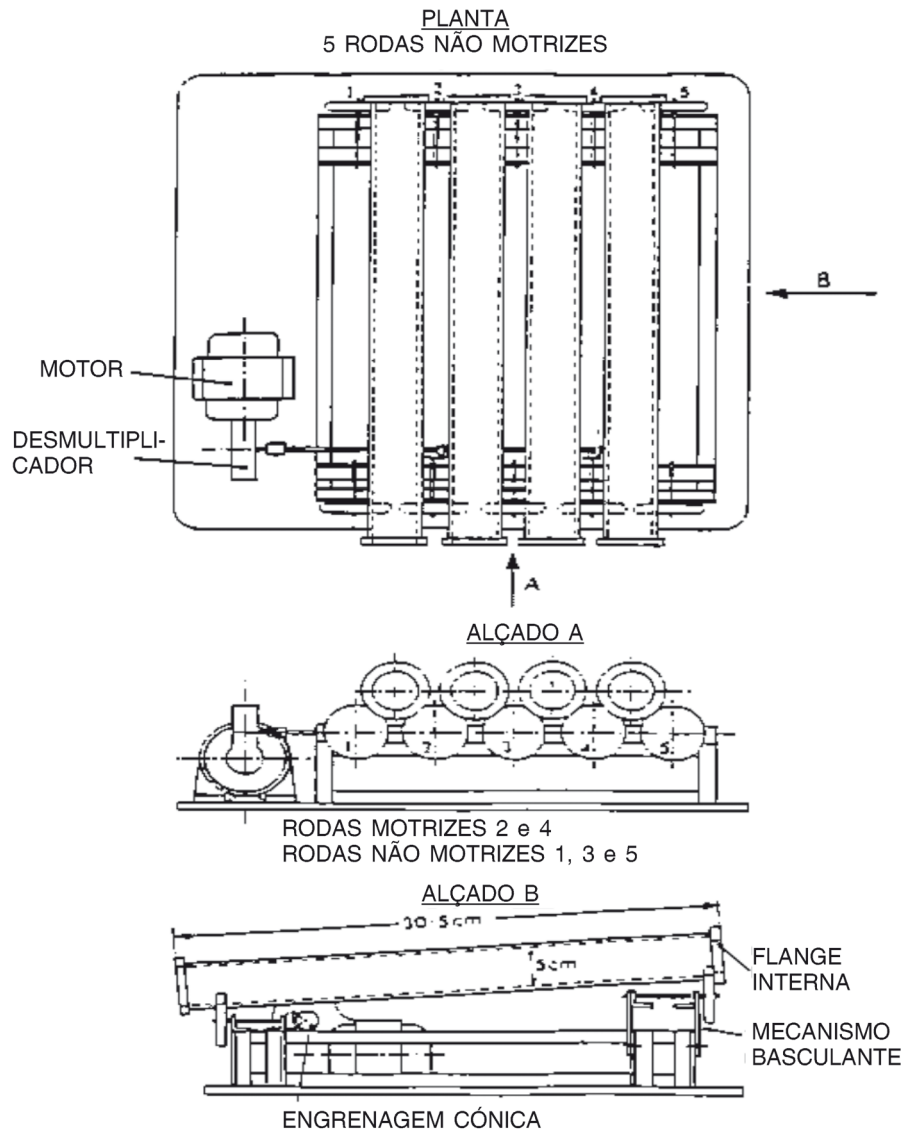
*REFERÊNCIAS:*

- (1) Gerike P., Fischer W., Holtmann W. (1980): Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. *Wat. Res.* 14: 753-758.
- (2) Truesdale G.A., Jones K., Vandyke K.G. (1959): Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material. *Wat. Waste Tr. J.* 7: 441-444.
- (3) Baumann U., Kuhn G., Benz M. (1998): Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. *Umweltchem. Ökotox.* 10: 214-220.
- (4) Gloyna E.F., Comstock R.F., Renn C.E. (1952): Rotary tubes as experimental trickling filters. *Sewage ind. Waste* 24: 1355-1357.
- (5) Kumke G.W., Renn C.E. (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. *JAOCS* 43: 92-94.
- (6) Tomlinson T.G., Snaddon D.H.M. (1966): Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. *Int.J. Air Wat. Pollut.* 10: 865-881.
- (7) Her Majesty's Stationery Office (1982): Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, Londres.
- (8) Her Majesty's Stationery Office (1984): Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, Londres.
- (9) Capítulo C.4 deste anexo: "Determinação da Biodegradabilidade 'Fácil', A-F".
- (10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

## Apêndice 8

Figura 1

## Tubos rotativos



## Glossário:

planta

alçado A/B

rodas motrizes

rodas não motrizes

motor

desmultiplicador

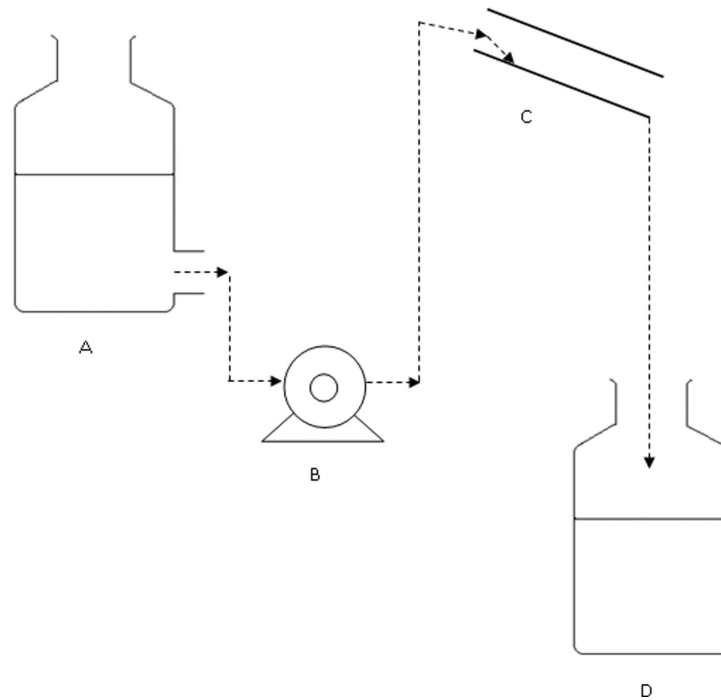
flange interna

mecanismo basculante

engrenagem cónica

Figura 2

## Diagrama das operações



- A: Tanque de alimentação  
 B: Bomba peristáltica  
 C: Tubo rotativo  
 D: Recipiente de recolha do efluente

## DEFINIÇÕES

Substância em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Produtos químicos: De notar que o termo "chemical", amplamente utilizado nos acordos UNCED e documentos posteriores, abrange substâncias, produtos, misturas, preparações ou quaisquer outros termos utilizados em sistemas existentes para denotar abrangência.»

10) São aditados os capítulos C.27, C.28, C.29 e C.30:

«C.27. ENSAIO DE TOXICIDADE EM QUIRONOMÍDEOS NUM SISTEMA SEDIMENTOS-ÁGUA COM SEDIMENTOS ENRIQUECIDOS

## INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 218 da OCDE (2004). Foi concebido para avaliar os efeitos nas larvas dos dípteros de água doce *Chironomus* sp., que vivem nos sedimentos, de uma exposição prolongada a determinados produtos químicos. Baseia-se nos atuais protocolos de ensaios de toxicidade para as espécies *Chironomus riparius* e *Chironomus tentans* que foram desenvolvidos na Europa (1)(2)(3) e na América do Norte (4)(5)(6)(7)(8) e foram sujeitos a um ensaio interlaboratorial (1)(6)(9). Pode também utilizar-se outras espécies de quironómídeos bem documentadas, como a *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).
2. O cenário de exposição utilizado neste método de ensaio passa pelo enriquecimento dos sedimentos na substância em estudo. A seleção do cenário de exposição adequado depende da finalidade do ensaio. A adição da substância em estudo aos sedimentos tem por objetivo simular a acumulação de produtos químicos persistentes nos sedimentos. Este sistema de exposição utiliza um sistema de ensaio sedimentos-água no qual os sedimentos foram enriquecidos no produto químico em estudo.
3. As substâncias a ensaiar com organismos que vivem nos sedimentos persistem, em geral, neste compartimento durante longos períodos. A exposição dos referidos organismos pode ter lugar por várias vias. A importância relativa de cada via de exposição, bem como o tempo de contribuição de cada uma delas para os efeitos tóxicos globais, depende das propriedades físico-químicas do produto químico em causa. No caso de substâncias fortemente adsorventes (por exemplo, com  $\log K_{ow} > 5$ ) ou de substâncias ligadas aos sedimentos por ligações

covalentes, a ingestão de alimentos contaminados pode constituir uma via de exposição significativa. Para não subestimar a toxicidade das substâncias altamente lipófilas, pode ponderar-se a utilização de alimentos adicionados aos sedimentos antes da aplicação da substância em estudo. De forma a ter em conta todas as vias de exposição potenciais, o presente método de ensaio focaliza-se na exposição a longo prazo. A duração do ensaio é de 20 a 28 dias para *C. riparius* e *C. yoshimatsui* e de 28 a 65 dias para *C. tentans*. Se forem necessários dados a curto prazo para uma finalidade específica (por exemplo, para investigar os efeitos de um produto químico), é possível utilizar replicados adicionais, a remover após dez dias.

4. Os parâmetros medidos são o número total de indivíduos adultos emergidos e o tempo necessário para tal. Se forem necessários dados adicionais a curto prazo, recomenda-se que as determinações da sobrevivência e do crescimento das larvas apenas sejam efetuadas após um período de dez dias, recorrendo aos replicados adicionais que se justifiquem.
5. Recomenda-se a utilização de sedimentos formulados. Estes apresentam várias vantagens relativamente aos sedimentos naturais:
  - a variabilidade experimental é reduzida porque os sedimentos constituem uma matriz "normalizada" reprodutível, eliminando-se a necessidade de encontrar fontes de sedimentos limpos e não contaminados,
  - os ensaios podem ser iniciados em qualquer momento, eliminando-se assim a variabilidade sazonal dos sedimentos ensaiados, não havendo necessidade de pré-tratar os sedimentos para remover a fauna indígena; a utilização de sedimentos formulados reduz também o custo associado à colheita no terreno de quantidades suficientes de sedimentos para os ensaios de rotina,
  - a utilização de sedimentos formulados permite ainda efetuar comparações de toxicidade e classificar as substâncias em conformidade.
6. Definem-se no apêndice 1 alguns conceitos utilizados.

#### PRINCÍPIO DO MÉTODO

7. São expostas larvas de quironómídeos do primeiro estágio larvar a uma gama de concentrações do produto químico em estudo em sistemas sedimentos-água. Os sedimentos são enriquecidos na substância em estudo, sendo as larvas do primeiro estágio larvar subsequentemente introduzidas em copos de ensaio nos quais as concentrações de sedimentos e da água foram estabilizadas. A emergência de quironómídeos e as respetivas taxas de desenvolvimento são medidas no final do ensaio. Se necessário, a sobrevivência e o peso das larvas podem também ser determinados decorridos 10 dias, utilizando os replicados adicionais que se justifiquem. Os dados são analisados por recurso a um modelo de regressão, de forma a estimar a concentração que causaria uma redução de x% na emergência, na sobrevivência ou no crescimento das larvas (por exemplo, CE<sub>15</sub>, CE<sub>50</sub>, etc.), ou utilizando hipóteses estatísticas, para determinar o NOEC/LOEC. Este último método exige a comparação de valores que produzem efeitos com valores de controlo, por recurso a testes estatísticos.

#### INFORMAÇÕES SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

8. Devem ser conhecidas a solubilidade em água e a pressão de vapor da substância em estudo, bem como a partição nos sedimentos medida ou calculada e a estabilidade na água e nos sedimentos. Para a quantificação da substância em estudo na água sobrenadante, na água dos poros e nos sedimentos, deve dispor-se de um método analítico fiável, com exatidão e limite de deteção conhecidos e documentados. A fórmula estrutural e o grau de pureza da substância constituem igualmente informações úteis. O comportamento químico da substância em estudo (p. ex.: dissipação, degradação abiótica ou biótica, etc.) é também uma informação importante. Para mais orientações sobre o ensaio de substâncias cujas propriedades físico-químicas dificultam a realização dos ensaios, consultar a referência bibliográfica (12).

#### PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA

9. Pode testar-se periodicamente produtos químicos de referência com o objetivo de garantir a fiabilidade do protocolo e das condições de ensaio. As seguintes substâncias constituem exemplos de substâncias tóxicas de referência utilizadas com êxito em ensaios interlaboratoriais e em estudos de validação: lindano, trifluralina, pentaclorofenol, cloreto de cádmio e cloreto de potássio (1)(2)(5)(6)(13).

#### VALIDADE DO ENSAIO

10. Um ensaio é considerado válido se forem cumpridas as seguintes condições:
  - a emergência nos controlos deve ser de, pelo menos, 70 % no final do ensaio (1)(6),
  - a emergência de indivíduos adultos das espécies *C. riparius* e *C. yoshimatsui* nos recipientes de controlo deve ocorrer 12 a 23 dias após a inserção destas espécies nos recipientes; no caso da *C. tentans*, é necessário um período de 20 a 65 dias,

- no final do ensaio, devem determinar-se o pH e a concentração de oxigénio dissolvido em cada recipiente. A concentração de oxigénio deve ser de, pelo menos, 60 % do valor da saturação com ar (VSA) à temperatura utilizada e o pH da água sobrenadante deve estar compreendido entre 6 e 9, em todos os recipientes de ensaio,
- a temperatura da água não deve variar mais de  $\pm 1,0$  °C. Esta temperatura pode ser controlada numa sala isotérmica, caso em que a temperatura ambiente deve ser confirmada a intervalos adequados.

#### DESCRIÇÃO DO MÉTODO

##### Recipientes de ensaio

11. O estudo é realizado em copos de vidro de 600 ml, com 8 cm de diâmetro. Pode utilizar-se outros recipientes, devendo contudo assegurar-se uma espessura adequada da água sobrenadante e dos sedimentos. A superfície dos sedimentos deve proporcionar 2 a 3 cm<sup>2</sup> por cada larva. O rácio entre a espessura da camada de sedimentos e a espessura da água sobrenadante deve ser de 1:4. Os recipientes de ensaio e o restante equipamento que entre em contacto com o sistema de ensaio devem ser exclusivamente de vidro ou de outro material quimicamente inerte (p. ex. Teflon).

##### Seleção das espécies

12. A espécie a utilizar de preferência no ensaio é a *Chironomus riparius*. A espécie *Chironomus tentans* também é adequada, mas é mais difícil de manipular e exige um período de ensaio mais longo. Pode igualmente utilizar-se a *Chironomus yohimatsui*. O apêndice 2 apresenta informações sobre os métodos de cultura de *Chironomus riparius*. Estão também disponíveis informações sobre as condições de cultura das espécies *Chironomus tentans* (4) e *Chironomus yohimatsui* (11). A identidade das espécies deve ser confirmada antes do ensaio, exceto no caso de organismos provenientes de uma cultura interna do laboratório.

##### Sedimentos

13. Devem ser utilizados, de preferência, sedimentos formulados (também chamados sedimentos reconstituídos, artificiais ou sintéticos). Contudo, se forem utilizados sedimentos naturais, estes devem ser caracterizados (pelo menos pH e teor de carbono orgânico, recomendando-se a determinação de outros parâmetros, tais como a razão C/N e a granulometria) e devem estar isentos de qualquer contaminação e de outros organismos que possam competir com os quironómídeos ou consumi-los. Recomenda-se igualmente que, antes de ser utilizados num ensaio de toxicidade em quironómídeos, os sedimentos naturais sejam acondicionados durante sete dias em condições semelhantes às do ensaio subsequente. Recomenda-se que sejam utilizados no presente ensaio (1)(15)(16) sedimentos formulados com a seguinte composição, baseada na do solo artificial utilizado no método C.8 (14):
  - a) 4-5 % (massa seca) de turfa: pH tão próximo quanto possível do intervalo 5,5-6,0; é importante utilizar turfa em pó, finamente moída (granulometria das partículas  $\leq 1$  mm), unicamente seca ao ar;
  - b) 20 % (massa seca) de argila caulínica, de preferência com teor de caulinite superior a 30 %;
  - c) 75-76 % (massa seca) de areia quartzítica, com predominância de areia fina com mais de 50 % de partículas de granulometria compreendida entre 50 e 200  $\mu$ m;
  - d) A quantidade de água desionizada necessária para que o teor de humidade da mistura final se situe na gama 30-50 %;
  - e) A quantidade de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) quimicamente puro necessária para ajustar o pH da mistura final dos sedimentos a  $7,0 \pm 0,5$ . O teor de carbono orgânico da mistura final deve ser de 2 %  $\pm$  0,5 %, devendo ser ajustado por recurso a quantidades adequadas de turfa e areia, em conformidade com as alíneas a) e c).
14. As origens da turfa, da argila caulínica e da areia devem ser conhecidas. Deve verificar-se a ausência de contaminação química (p. ex., metais pesados, compostos organoclorados, compostos organofosforados, etc.) nos componentes dos sedimentos. No apêndice 3, apresenta-se um exemplo de preparação de sedimentos formulados. Uma mistura de componentes secos também é aceitável caso se demonstre que, após a adição da água sobrenadante, não ocorre separação de componentes dos sedimentos (por exemplo, partículas de turfa flutuantes) e que a turfa ou os sedimentos estão suficientemente acondicionados.

##### Água

15. Qualquer água com as características químicas de uma água de diluição aceitável enunciadas nos apêndices 2 e 4 é adequada para o ensaio. Para a cultura e o ensaio, pode utilizar-se qualquer água adequada, água natural (superficial ou subterrânea), água reconstituída (ver o apêndice 2) ou água da rede de abastecimento desclorada, desde que os quironómídeos nela sobrevivam durante todo o período de cultura e de ensaio sem evidenciarem sinais de stress. No início do ensaio, o pH da água de ensaio deve estar compreendido entre 6 e 9 e a dureza total



da água, expressa em  $\text{CaCO}_3$ , não deve exceder 400 mg/l. No entanto, caso se suspeite de uma interação entre os iões responsáveis pela dureza e a substância em estudo, deve utilizar-se uma água de dureza inferior (nessa eventualidade, o meio Elendt M4 não pode ser utilizado). Deve utilizar-se o mesmo tipo de água em todo o estudo. As características de qualidade da água enumeradas no apêndice 4 devem ser determinadas pelo menos duas vezes por ano, ou sempre que se suspeite que tenham mudado significativamente.

#### **Soluções-mãe — sedimentos enriquecidos**

16. O enriquecimento dos sedimentos na concentração escolhida é geralmente efetuado por adição direta de uma solução da substância em estudo. Com o auxílio de um moinho de rolos ou de um misturador de alimentos, ou manualmente, adiciona-se aos sedimentos formulados uma solução-mãe da substância em estudo, dissolvida em água desionizada. Se a substância for pouco solúvel em água, pode ser dissolvida num volume tão baixo quanto possível de um solvente orgânico adequado (por exemplo, hexano, acetona ou clorofórmio). Seguidamente, esta solução é misturada com 10 g de areia quartzítica fina por recipiente de ensaio. Deixa-se evaporar o solvente até à sua eliminação total da areia; adiciona-se, então, esta à quantidade adequada de sedimentos por cada copo de ensaio. Para solubilizar, dispersar ou emulsionar a substância em estudo apenas podem utilizar-se agentes de fácil volatilização. Ao preparar os sedimentos, importa ter em conta a areia associada à substância em estudo e a mistura de areia (ou seja, utiliza-se menos areia na preparação dos sedimentos). Deve ter-se o cuidado de assegurar que a substância em estudo adicionada aos sedimentos se encontra total e uniformemente distribuída nestes. Se necessário, podem analisar-se subamostras, a fim de determinar o grau de homogeneidade.

#### **PLANEAMENTO DO ENSAIO**

17. O planeamento do ensaio consiste na escolha do número e dos intervalos das concentrações de ensaio, do número de recipientes para cada concentração e do número de larvas por recipiente. Descreve-se de seguida o método de estimativa dos pontos CE e do NOEC, bem como de realização de ensaios do limite.

#### **Análise por regressão**

18. As concentrações testadas no ensaio deverão incluir as concentrações às quais se observam efeitos (por exemplo,  $\text{CE}_{15}$  e  $\text{CE}_{50}$ ) e abranger a gama de concentrações para as quais o efeito da substância em estudo é significativo. De modo geral, é possível melhorar a exatidão e, em especial, a validade das estimativas das concentrações que produzem efeitos ( $\text{CE}_x$ ) se essas concentrações se situarem na gama de concentrações ensaiadas. Devem evitar-se extrapolações muito abaixo da concentração positiva mais baixa ou acima da concentração mais elevada. É útil efetuar um ensaio exploratório preliminar para a escolha da gama de concentrações a utilizar no ensaio (ver o ponto 27).
19. Caso se pretenda estimar uma  $\text{CE}_x$ , devem ser utilizados, pelo menos, cinco concentrações e três replicados de cada concentração. Em qualquer caso, para obter uma boa estimativa, é aconselhável ensaiar um número suficiente de concentrações. O fator entre as concentrações não deve ser superior a dois (se a curva de resposta à dose tiver um declive reduzido). Pode reduzir-se o número de replicados de cada concentração se for aumentado o número de concentrações de ensaio com respostas diferentes. O aumento do número de replicados ou a redução dos intervalos entre concentrações produz, em geral, intervalos de confiança mais estreitos. Caso se pretenda estimar a sobrevivência e o crescimento das larvas a 10 dias, é necessário utilizar mais replicados.

#### **Estimativa de NOEC/LOEC**

20. Caso se pretenda estimar o NOEC ou o LOEC, devem ensaiar-se cinco concentrações com, pelo menos, quatro replicados, não devendo o fator entre as concentrações ser superior a dois. O número de replicados deverá ser suficiente para garantir a possibilidade estatística de detetar de forma adequada uma diferença de 20 % relativamente ao controlo, com um grau de significância de 5 % ( $p = 0,05$ ). No respeitante às taxas de desenvolvimento, é geralmente adequada uma análise de variância (ANOVA), como o teste de Dunnett ou o teste de Williams (17)(18)(19)(20). Quanto à taxa de emergência, podem utilizar-se os testes de Cochran-Armitage, o teste exato de Fisher (com a correção de Bonferroni) ou o teste de Mantel-Haentzel.

#### **Ensaio do limite**

21. Caso não sejam detetados efeitos no ensaio exploratório preliminar de seleção das concentrações, pode proceder-se a um ensaio do limite (uma concentração de ensaio e uma de controlo). O objetivo consiste em realizar um ensaio numa concentração suficientemente elevada para permitir aos decisores excluir a possibilidade de efeitos tóxicos da substância em estudo, sendo o limite fixado a uma concentração cuja ocorrência não se prevê em caso algum. Recomenda-se a utilização de 1 000 mg/kg (massa seca). Em geral, são necessários, pelo menos, seis replicados dos organismos expostos e de controlo. Deve comprovar-se existir a possibilidade estatística de detetar de forma adequada uma diferença de 20 % relativamente ao controlo, com um grau de significância de 5 % ( $p = 0,05$ ). No que respeita ao efeito nas taxas de desenvolvimento e na massa, o teste  $t$  é um método estatístico adequado se os dados cumprirem os requisitos do teste (normalidade e variâncias homogéneas). Se estes requisitos não forem preenchidos, pode utilizar-se um teste  $t$  de variância desigual ou um teste não paramétrico, como o de Wilcoxon-Mann-Whitney. No que respeita à taxa de emergência, o teste exato de Fisher é adequado.

## PROCEDIMENTO

**Condições de exposição***Preparação do sistema sedimentos enriquecidos-água*

22. Na aplicação da substância em estudo, recomenda-se o procedimento de enriquecimento descrito no método de ensaio C.8: "Toxicidade em relação às minhocas" (14). Coloca-se nos recipientes os sedimentos enriquecidos, adicionando-se água sobrenadante de forma a obter uma razão volúmica sedimentos-água de 1:4 (ver os pontos 11 e 15). A espessura da camada de sedimentos deve situar-se na gama 1,5-3 cm. Para evitar a separação de componentes dos sedimentos e a ressuspensão de materiais finos durante a criação da coluna de água, os sedimentos podem ser cobertos, enquanto a água é vertida, com um disco de plástico que se remove imediatamente depois. Podem também utilizar-se outros dispositivos.
23. Os recipientes de ensaio devem ser cobertos (por exemplo, com placas de vidro). Se necessário, o nível inicial de água pode ser repostado durante o ensaio, para compensar a evaporação. Para tal, deve utilizar-se água destilada ou desionizada, de modo a evitar a acumulação de sais.

*Estabilização*

24. Quando estiverem preparados os sedimentos enriquecidos e a fase aquosa sobrenadante, é conveniente permitir a partição da substância em estudo entre a fase aquosa e os sedimentos (3)(4)(6)(13). A partição deve ocorrer, de preferência, às condições de temperatura e arejamento utilizadas no ensaio. O tempo necessário para atingir o equilíbrio depende dos sedimentos e do produto químico, podendo variar de algumas horas a vários dias e mesmo, em casos raros, a 4 ou 5 semanas. Dado que, nesse período, muitos produtos químicos são passíveis de sofrer degradação, não se espera até o equilíbrio total ser alcançado, recomendando-se a adoção de um período de equilíbrio de 48 horas. No final deste período, deve medir-se a concentração da substância em estudo na água sobrenadante, na água dos poros e nos sedimentos, pelo menos no caso da concentração máxima e de uma concentração menor (ver o ponto 38). Estas determinações analíticas da substância em estudo permitem o cálculo do balanço de massas e a expressão dos resultados com base nas concentrações medidas.

*Introdução dos organismos em estudo*

25. Quatro a cinco dias antes da introdução dos organismos em estudo nos recipientes de ensaio, devem colher-se aglomerados de ovos das culturas e colocá-los em pequenos recipientes com o meio de cultura. Pode utilizar-se meio proveniente da cultura-mãe ou um meio recentemente preparado. Neste último caso, importa adicionar ao meio de cultura uma pequena quantidade de alimentos, como, por exemplo, algas verdes e/ou algumas gotas de filtrado de uma suspensão de alimento para peixes finamente moído (ver o apêndice 2). Apenas devem ser utilizados aglomerados de ovos de postura recente. Normalmente, as larvas começam a eclodir alguns dias após a postura dos ovos (2 a 3 dias, a 20 °C, no caso das *Chironomus riparius*, e 1 a 4 dias no caso das *Chironomus tentans*, a 23 °C, e das *Chironomus yoshimatsui*, a 25 °C); o crescimento das larvas ocorre em quatro estádios larvares, cada um com a duração de 4 a 8 dias. Utilizar no ensaio larvas do primeiro estágio larvar (2-3 ou 1-4 dias após a eclosão). O estágio larvar dos insetos pode, eventualmente, ser verificado por exame da largura da cápsula cefálica (6).
26. Com o auxílio de uma pipeta embotada, coloca-se aleatoriamente vinte larvas do primeiro estágio larvar em cada recipiente de ensaio contendo os sedimentos enriquecidos e a água. O arejamento da água tem de ser suspenso durante a colocação das larvas nos recipientes de ensaio, assim permanecendo nas 24 horas subsequentes a esta operação (ver os pontos 25 e 32). Consoante o tipo de ensaio realizado (ver os pontos 19 e 20), o número de larvas por concentração deve ser, no mínimo, de 60, no caso de estimativas de pontos CE, e de 80, no caso das determinações de NOEC.

*Concentrações de ensaio*

27. Pode ser útil efetuar um ensaio exploratório para a determinação da gama de concentrações a utilizar no ensaio definitivo. Para o efeito, recorre-se a uma série de concentrações espaçadas da substância em estudo. Garantindo que a densidade de quironomídeos por unidade de superfície seja idêntica à utilizada no ensaio definitivo, os quironomídeos são expostos a cada concentração da substância em estudo por um período que permita uma estimativa das concentrações de ensaio adequadas, não sendo necessários replicados.
28. As concentrações a utilizar no ensaio definitivo são decididas com base nos resultados do ensaio exploratório. Devem ser utilizadas pelo menos cinco concentrações, selecionadas do modo descrito nos pontos 18 a 20.

*Controlos*

29. Deve utilizar-se no ensaio um número adequado de recipientes de controlo sem a substância em estudo, mas com os sedimentos (ver os pontos 19-20). Caso se recorra a um solvente para a incorporação da substância em estudo (ver o ponto 16), deve efetuar-se um controlo utilizando sedimentos com solvente.

#### Sistema de ensaio

30. São utilizados sistemas estáticos. Em casos excepcionais, pode utilizar-se sistemas semiestáticos ou sistemas de escoamento com renovação intermitente ou contínua da água sobrenadante, por exemplo, se as características de qualidade da água se tornarem inadequadas ao organismo em estudo ou afetarem o equilíbrio químico (isto é, se os teores de oxigénio dissolvido baixarem demasiado, se a concentração de produtos de excreção aumentar demasiado, se ocorrer lixiviação de minerais dos sedimentos que afete o pH e/ou dureza da água, etc.). Deve preferir-se, contudo, o recurso a outros métodos para melhorar a qualidade da água sobrenadante, como o arejamento, que é, em geral, suficiente.

#### Alimentação

31. É necessário alimentar as larvas, de preferência diariamente ou, no mínimo, três vezes por semana. Utilizar alimento para peixes (suspensão em água ou finamente moído, por exemplo, Tetra-Min or Tetra-Phyllou; ver pormenores no apêndice 2); a quantidade de 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg no caso de *C. yoshimatsui*) por larva e dia afigura-se adequada para as larvas jovens, nos primeiros 10 dias. Após este período, pode ser necessária uma quantidade ligeiramente superior: 0,5-1 mg por larva e dia deve bastar para o resto do ensaio. A ração alimentar deve ser reduzida a todos os organismos expostos e aos controlos caso se observe crescimento fúngico ou se verifique mortalidade nos controlos. Se não for possível impedir o crescimento fúngico, deve repetir-se o ensaio. Quando se estuda substâncias fortemente adsorventes (por exemplo, com  $\log K_{ow} > 5$ ) ou substâncias ligadas aos sedimentos por ligações covalentes, a quantidade de alimentos necessária para assegurar a sobrevivência e o crescimento natural dos organismos pode ser adicionada aos sedimentos formulados, antes do período de estabilização. Para esse fim, devem ser utilizados matérias vegetais em vez de alimentos para peixes; a título de exemplo, 0,5 % (massa seca) de folhas finamente moídas de espécies como a urtiga comum (*Urtica dioeca*), a amoreira (*Morus alba*), o trevo branco (*Trifolium repens*), o espinafre (*Spinacia oleracea*) ou outras matérias de origem vegetal (*Cerophyl* ou  $\alpha$ -celulose).

#### Condições de incubação

32. O arejamento ligeiro da água sobrenadante nos recipientes de ensaio deve iniciar-se, de preferência, 24 horas após a introdução das larvas, prosseguindo ao longo de todo o ensaio (deve evitar-se que a concentração de oxigénio dissolvido baixe para valores inferiores a 60 % do VSA). O arejamento é efetuado por intermédio de uma pipeta de Pasteur de vidro, fixada 2-3 cm acima da camada de sedimentos (caudal: uma ou poucas bolhas por segundo). No ensaio de produtos químicos voláteis, pode optar-se por não arejar o sistema sedimentos-água.
33. O ensaio é realizado a temperatura constante ( $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). No caso das espécies *C. tentans* e *C. yoshimatsui*, as temperaturas recomendadas são  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $25\text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C})$ , respetivamente. Utiliza-se um período de irradiação de 16 horas, com uma intensidade luminosa de 500 a 1 000 lux.

#### Duração da exposição

34. A exposição começa com a introdução das larvas nos recipientes enriquecidos e nos recipientes de controlo. A duração máxima da exposição é de 28 dias para a *C. riparius* e a *C. yoshimatsui* e de 65 dias para a *C. tentans*. Se os insetos emergirem precocemente, pode pôr-se termo ao ensaio, no mínimo, cinco dias após a emergência do último indivíduo adulto nos recipientes de controlo.

#### Observações

##### Emergência

35. Determina-se o tempo de desenvolvimento e o número total de insetos machos e fêmeas totalmente emergidos. Os machos são facilmente identificados pelas suas antenas plumosas.
36. Os recipientes de ensaio devem ser observados pelo menos três vezes por semana, a fim de apreciar visualmente qualquer comportamento anormal (por exemplo, saída dos sedimentos, natação anormal) em relação aos recipientes de controlo. Durante o período de emergência previsto, é necessário proceder à contagem diária dos insetos emergidos. O sexo e o número de insetos totalmente emergidos são registados diariamente. Após a identificação, remove-se os insetos dos recipientes. Quaisquer aglomerados de ovos postos antes do termo do ensaio devem ser registados e, de seguida, removidos, para evitar a reintrodução de larvas nos sedimentos. Regista-se também o número de ninfas visíveis que não emergiram. O apêndice 5 contém orientações sobre a mensuração da emergência.

##### Crescimento e sobrevivência

37. Se for necessário obter dados sobre a sobrevivência e o crescimento das larvas em dez dias, devem prever-se recipientes de ensaio suplementares desde o início, para que possam ser utilizados posteriormente. Os sedimentos destes recipientes são passados por um crivo com abertura de malha de 250  $\mu\text{m}$ , para reter as larvas. Os critérios de morte são a imobilidade e a ausência de reação a estímulos mecânicos. As larvas não recuperadas devem também ser contadas como mortas (as larvas que morreram no início do ensaio podem ter sido degradadas por micróbios). Determina-se a massa seca, isenta de cinzas, de larvas sobreviventes em cada recipiente de ensaio, calculando-se a massa seca média por recipiente. É útil determinar o estágio larvar das larvas sobreviventes; para tal, pode recorrer-se à medição da largura da cápsula cefálica de cada indivíduo.

### Determinações analíticas

#### *Concentração da substância em estudo*

38. Antes do início do ensaio (isto é, da introdução das larvas), procede-se à colheita de amostras da massa de sedimentos de, pelo menos, um recipiente por exposição, para a determinação analítica da concentração da substância em estudo. Recomenda-se que sejam analisadas, no início (ver o ponto 24) e no final do ensaio, no mínimo, amostras da água sobrenadante, da água dos poros e dos sedimentos correspondentes à concentração mais elevada e a uma concentração inferior. Estas determinações da concentração da substância em estudo proporcionam informações sobre o comportamento e/ou a partição da mesma no sistema água-sedimentos.
39. Quando se efetuam medições intermédias (por exemplo, no 7.º dia) e a análise necessita de amostras grandes que não podem ser colhidas dos recipientes de ensaio sem influenciar o sistema em estudo, as determinações analíticas devem ser realizadas com amostras colhidas de recipientes de ensaio suplementares tratados da mesma forma (incluindo a presença dos organismos em estudo), mas que não são alvo de observações biológicas.
40. A centrifugação a cerca de 10 000 g e 4 °C, durante 30 minutos, é o procedimento recomendado para isolar a água intersticial. No entanto, caso se demonstre que a substância em estudo não é adsorvida aos filtros, a filtragem também é aceitável. Em alguns casos, se a amostra for demasiado pequena, poderá não ser possível analisar concentrações na água dos poros.

#### *Parâmetros físico-químicos*

41. O pH e a temperatura dos recipientes de ensaio devem ser medidos de forma adequada (ver o ponto 10). A dureza e o ião amónio devem ser medidos nos recipientes de controlo e num recipiente de ensaio com a concentração mais elevada, no início e no final do ensaio.

### DADOS E RELATÓRIOS

#### *Tratamento dos resultados*

42. O objetivo deste ensaio consiste em determinar o efeito da substância em estudo nas taxas de desenvolvimento e no número total de insetos machos e fêmeas totalmente emergidos ou, no caso dos ensaios de 10 dias, os efeitos na sobrevivência e no peso das larvas. Se não houver indicação de sensibilidades estatisticamente diferentes entre os sexos, os resultados relativos aos machos e às fêmeas podem ser agrupados para efeitos de análise estatística. As diferenças de sensibilidade entre os sexos podem ser avaliadas estatisticamente, por exemplo, recorrendo a um ensaio de tabela de contingência  $\chi^2$ -r x 2. Se necessário, determina-se a sobrevivência das larvas e a massa seca por recipiente após 10 dias.
43. As concentrações com efeitos, expressas em relação à massa seca, são calculadas de preferência a partir das concentrações medidas nos sedimentos no início do ensaio (ver o ponto 38).
44. Para efetuar uma estimativa pontual do valor  $CE_{50}$  ou de qualquer valor  $CE_x$ , podem equiparar-se os dados estatísticos por recipiente aos de ensaios idênticos reais. No cálculo de um intervalo de confiança para qualquer valor  $CE_x$ , importa ter em conta a variabilidade entre recipientes, ou deve demonstrar-se que essa variabilidade é tão reduzida que pode ser ignorada. Se o modelo for ajustado pelo método dos mínimos quadrados, deve aplicar-se uma transformação aos dados estatísticos por recipiente, para melhorar a homogeneidade da variância. Contudo, os valores de  $CE_x$  só devem ser calculados após retransformação da resposta no valor inicial.
45. Se a análise estatística tiver por objetivo determinar o NOEC/LOEC utilizando hipóteses estatísticas, importa ter em conta a variabilidade entre recipientes, por exemplo, aplicando um método ANOVA hierarquizado. Se não se verificarem os pressupostos comuns do método ANOVA, testes mais robustos podem constituir uma alternativa adequada (21).

#### *Taxa de emergência*

46. As taxas de emergência são dados de "tudo ou nada", que podem ser analisados através de um teste de Cochran-Armitage aplicado de forma regressiva, nos casos em que se prevê uma relação monótona entre a dose fornecida e a resposta e os dados são compatíveis com a previsão. Caso contrário, pode recorrer-se a um teste exato de Fisher ou a um teste de Mantel-Haentz com valores  $p$  ajustados segundo o método de Bonferroni-Holm. Se, para a mesma concentração, houver indícios de uma maior variabilidade entre replicados do que a sugerida por uma distribuição binomial (frequentemente referida como variação "extrabinomial"), deve utilizar-se um teste exato de Fisher ou um teste de Cochran-Armitage robusto, como proposto na referência 21.

Determina-se a soma dos insetos emergidos por recipiente,  $n_e$ , que é seguidamente dividida pelo número de larvas nele introduzidas,  $n_a$ :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

em que:

$ER$  = Taxa de emergência

$n_e$  = Número de insetos emergidos no recipiente

$n_a$  = Número de larvas introduzidas no recipiente

47. Uma alternativa mais adequada a amostras grandes, quando se regista variância extrabinomial, consiste em considerar a taxa de emergência uma resposta contínua e aplicar procedimentos como o teste de William, caso se preveja uma relação monótona entre a dose fornecida e a resposta, compatível com os dados de taxa de emergência em causa. Por seu turno, o teste de Dunnett é adequado aos casos em que não se regista uma relação monótona. Neste contexto, uma amostra "grande" é definida como aquela em que o número total de insetos emergidos e não emergidos é, em ambos os casos, superior a cinco por replicado (recipiente).
48. A aplicação de métodos ANOVA implica que os valores de taxa de emergência sejam sujeitos a uma transformação de arco-seno da raiz quadrada ou a uma transformação de Tukey-Freeman, de forma a obter uma distribuição aproximadamente normal e uniformizar as variâncias. Os testes de Cochran-Armitage, exato de Fisher (Bonferroni) e Mantel-Haentzel podem ser aplicados quando se utilizam frequências absolutas. A transformação de arco-seno da raiz quadrada consiste em calcular o inverso do seno ( $\sin^{-1}$ ) da raiz quadrada do valor da taxa de emergência.
49. No respeitante às taxas de emergência, os valores de  $CE_x$  são calculados por análise de regressão – por exemplo, por recurso aos modelos *probit* (22), *logit* ou Weibull ou a programas informáticos comerciais adequados. Em caso de fracasso da análise de regressão (por exemplo, se o número de respostas parciais for inferior a dois), utilizam-se outros métodos não paramétricos, como a média móvel ou a simples interpolação.

#### Taxa de desenvolvimento

50. O tempo médio de desenvolvimento representa o tempo médio decorrido entre a introdução das larvas (dia 0 do ensaio) e a emergência da coorte experimental de insetos (para o cálculo do tempo de desenvolvimento real, é necessário ter em conta a idade das larvas no momento da introdução). A taxa de desenvolvimento é o inverso do tempo de desenvolvimento (unidade: 1/dia) e representa a quantidade de desenvolvimento larvar que ocorre por dia. A taxa de desenvolvimento é o parâmetro preferido para a avaliação destes estudos de toxicidade dos sedimentos, dado que a sua variância é mais baixa que a do tempo de desenvolvimento, sendo também mais homogênea e mais próxima da distribuição normal. Os testes paramétricos mais potentes estão mais adaptados à taxa de desenvolvimento do que ao tempo de desenvolvimento. Considerando a taxa de desenvolvimento uma resposta contínua, os valores de  $CE_x$  podem ser estimados por recurso a uma análise de regressão – por exemplo, como descrito em (23)(24).
51. No contexto dos testes estatísticos que se seguem, considera-se que o número de insetos observado no dia de inspeção  $x$  emergiu no ponto médio do intervalo de tempo compreendido entre o dia  $x$  e o dia  $x-d$  ( $d$  = duração do intervalo de inspeção, em geral 1 dia). A taxa de desenvolvimento média por recipiente (é calculada com base nas seguintes equações:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

em que:

$\bar{x}$ : Taxa de desenvolvimento média por recipiente

$i$ : Índice do intervalo de inspeção

$m$ : Número máximo de intervalos de inspeção

$f_i$ : Número de insetos emergidos no intervalo de inspeção  $i$

$n_e$ : Número total de insetos emergidos no final do ensaio (=  $\sum f_i$ )

$x_i$ : Taxa de desenvolvimento dos insetos emergidos no intervalo  $i$

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{dia}_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

em que:

$\text{dia}_i$ : Dia da inspeção (n.º de dias decorridos desde a introdução dos organismos)

$d_i$ : Duração do intervalo de inspeção  $i$  (dias, em geral 1 dia)

**Relatório dos ensaios**

52. O relatório dos ensaios deve incluir, no mínimo, as seguintes informações:

*Substância em estudo:*

- natureza física e, quando pertinente, propriedades físico-químicas (solubilidade na água, pressão de vapor, coeficiente de partição no solo — ou nos sedimentos, se disponível —, estabilidade em água, etc.),
- dados de identificação química (denominação comum, denominação química, fórmula estrutural, número CAS, etc.), incluindo o grau de pureza e o método analítico de quantificação da substância.

*Espécies utilizadas nos ensaios:*

- animais: espécie, nome científico, origem dos organismos e condições de reprodução,
- informações sobre o manuseamento dos aglomerados de ovos e das larvas,
- idade dos animais quando introduzidos nos recipientes de ensaio.

*Condições experimentais:*

- sedimentos utilizados, isto é, de origem natural ou formulados,
- no caso dos sedimentos naturais, localização e descrição do local de colheita, incluindo, se possível, o historial de contaminação; características: pH, teor de carbono orgânico, razão C/N e granulometria (se pertinente),
- preparação dos sedimentos formulados: ingredientes e características (teor de carbono orgânico, pH, humidade, etc., no início dos ensaios),
- preparação da água para os ensaios, caso seja utilizada água reconstituída, e respetivas características (concentração de oxigénio, pH, condutividade, dureza, etc., no início dos ensaios),
- espessura dos sedimentos e da água sobrenadante,
- volume de água sobrenadante e de água dos poros; massa do sedimento húmido com e sem a água dos poros,
- recipientes de ensaio (material e dimensões),
- método de enriquecimento dos sedimentos: concentrações de ensaio utilizadas, número de replicados e solvente utilizado, se for o caso,
- fase de estabilização do sistema sedimentos enriquecidos-água: duração e condições,
- condições de incubação: temperatura, ciclo de luz e intensidade luminosa, arejamento (frequência e intensidade),
- informações pormenorizadas sobre a alimentação dos organismos, incluindo o tipo de alimentos, a preparação, a quantidade e o regime alimentar.

*Resultados:*

- concentrações de ensaio nominais, concentrações de ensaio medidas e resultados de todas as análises efetuadas para determinar a concentração da substância em estudo nos recipientes de ensaio,
- qualidade da água nos recipientes de ensaio (pH, temperatura, oxigénio dissolvido, dureza e teor de ião amónio),
- renovação da água evaporada nos ensaios, se for o caso,
- número de insetos machos e fêmeas emergidos por recipiente e dia,
- número de larvas que não originaram insetos, por recipiente,
- massa seca média de larvas por recipiente e, se for caso disso, por estágio larvar,
- percentagem de emergência por replicado e por concentração de ensaio (machos e fêmeas no seu conjunto),

- taxa média de desenvolvimento de insetos totalmente emergidos por replicado e por concentração de ensaio (machos e fêmeas no seu conjunto),
- estimativas de parâmetros de toxicidade, como, por exemplo, CEx (e os intervalos de confiança associados), NOEC e/ou LOEC e métodos estatísticos utilizados para a determinação dos mesmos,
- discussão dos resultados, incluindo qualquer influência nos resultados do ensaio decorrente de alterações efetuadas ao presente método de ensaio.

#### REFERÊNCIAS:

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Editado por M. Streloke e H. Köpp. Berlim, 1995.
- (2) Fleming R. *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. Agosto de 1994. WRc, Reino Unido.
- (3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. WOSTA Workshop realizado nos Países Baixos.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. p. 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International. West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. Dezembro de 1997.
- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Segunda edição. EPA 600/R-99/064. Março de 2000. Revisão da primeira edição de junho de 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., Kirby R.S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontário, Canadá.
- (10) Sugaya Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. *Jp. J. Sanit. Zool.* 48 (4): 345-350.
- (11) Kawai K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). *Jp. J. Sanit. Zool.* 37(1): 47-57.
- (12) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. Setembro de 1995.
- (14) Capítulo C.8 deste anexo: Toxicidade em relação às minhocas.
- (15) Suedel B.C., Rodgers J.H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1163-1175.
- (16) Naylor C., Rodrigues C. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere* 31: 3291-3303.

- 
- (17) Dunnett C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121.
- (18) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- (19) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
- (20) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510-531.
- (21) Rao J.N.K., Scott A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48: 577-585.
- (22) Christensen E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213-221.
- (23) Bruce, Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 1485-1494.
- (24) Slob W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.
-



*Apêndice 1*

## DEFINIÇÕES

No âmbito do presente método de ensaio, aplicam-se as seguintes definições:

**Sedimentos formulados** ou reconstituídos, artificiais ou sintéticos: mistura de matérias utilizadas para simular os componentes físicos de sedimentos naturais.

**Água sobrenadante**: água situada acima da superfície dos sedimentos, no recipiente de ensaio.

**Água intersticial** ou água dos poros: água que ocupa o espaço entre as partículas de sedimentos e de solo.

**Sedimentos enriquecidos**: sedimentos aos quais foi adicionada a substância em estudo.

**Produto químico em estudo**: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

---

## Apêndice 2

### Recomendações para a cultura de *chironomus riparius*

1. As larvas de *Chironomus* podem ser criadas em caixas de cristalização ou recipientes de maiores dimensões. Espalha-se no fundo do recipiente areia quartzítica fina de modo a constituir uma camada fina com 5 a 10 mm de espessura. Verificou-se que o *kieselguhr* (p. ex. Merck 8117) é também um substrato adequado; neste caso, pode utilizar-se uma camada mais fina, da ordem de poucos milímetros. Adiciona-se de seguida uma coluna de vários centímetros de uma água adequada. Se necessário, os níveis de água podem ser repostos para compensar a evaporação e evitar a dessecação. A água pode ser substituída, se necessário. Deve efetuar-se um arejamento ligeiro. Os recipientes de criação das larvas devem ser mantidos em gaiolas adequadas, de forma a evitar fugas de adultos emergentes. A gaiola deve ser suficientemente grande (no mínimo, cerca de 30 x 30 x 30 cm), para permitir a enxameação dos adultos emergidos, sem o que poderá não ocorrer copulação.
2. As gaiolas devem ser mantidas à temperatura ambiente ou a uma temperatura constante de  $20 \pm 2$  °C, com um período de luminosidade (cerca de 1 000 lux) de 16 horas e oito horas de escuridão. Existem referências documentais de que um teor de humidade relativa do ar inferior a 60 % pode impedir a reprodução.

### Água de diluição

3. Pode utilizar-se qualquer água natural ou reconstituída adequada. Utiliza-se em geral água de poços, água da rede de abastecimento desclorada e meios artificiais (por exemplo, meio Elendt M4 ou M7; ver abaixo). A água tem de ser arejada antes da utilização. Se necessário, a água das culturas pode ser renovada por vazamento ou sifonagem cuidadoso da água dos recipientes de cultura, para não destruir os tubos das larvas.

### Alimentação das larvas

4. As larvas de *Chironomus* são alimentadas com cerca de 250 mg por recipiente e por dia de um alimento floculado para peixes (Tetra Min®, Tetra Phyll® ou outra marca semelhante). Os alimentos podem ser administrados na forma de um pó seco finamente moído ou de uma suspensão em água: adicionar 1,0 g de alimento floculado a 20 ml de água de diluição e misturar de modo a obter uma mistura homogénea. Esta preparação pode ser administrada ao caudal aproximado de 5 ml por recipiente e por dia (agitar antes da utilização). Pode administrar-se às larvas de idade superior uma maior quantidade de alimento.
5. A alimentação é ajustada em função da qualidade da água. Se o meio de cultura se tornar turvo, deve reduzir-se a alimentação. A administração de alimentos deve ser objeto de um registo minucioso. A escassez de alimentos causaria migração das larvas para a coluna de água, enquanto uma alimentação demasiado rica aumentaria a atividade microbiana e reduziria a concentração de oxigénio. Ambas estas condições podem resultar numa redução das taxas de crescimento.
6. Ao preparar novos recipientes de cultura, podem também adicionar-se algumas células de algas verdes (por exemplo, *Scenedesmus subspicatus* e *Chlorella vulgaris*).

### Alimentação dos adultos emergidos

7. Alguns investigadores sugeriram que um tampão de algodão embebido numa solução saturada de sacarose pode servir de alimento para os adultos emergidos.

### Emergência

8. À temperatura de  $20 \pm 2$  °C, os adultos começam a emergir dos recipientes de criação das larvas decorridos 13 a 15 dias. Os machos são facilmente distinguidos pelas suas antenas plumosas.

### Aglomerados de ovos

9. Quando se encontrarem presentes adultos nas gaiolas de criação, deve verificar-se três vezes por semana se ocorre a deposição de aglomerados gelatinosos de ovos nos recipientes de criação das larvas. Se tal suceder, devem ser removidos com cuidado e transferidos para uma pequena cápsula com uma amostra da água de incubação. Os aglomerados de ovos são utilizados para iniciar novas culturas noutros recipientes (p. ex., 2-4 aglomerados de ovos por recipiente) ou em ensaios de toxicidade.
10. As larvas do primeiro estágio larvar devem eclodir decorridos 2-3 dias.

### Preparação de novos recipientes de cultura

11. Quando as culturas estiverem estabelecidas, deverá ser possível preparar um novo recipiente de cultura de larvas por semana, ou com uma frequência menor (consoante os requisitos dos ensaios), removendo os recipientes mais antigos após a emergência dos insetos adultos. O recurso a este sistema permite obter um aprovisionamento regular de insetos adultos com uma gestão mínima.

### Preparação das soluções de ensaio M4 e M7

12. O meio M4 foi descrito por Elenndt (1990). O meio M7 é preparado do mesmo modo que o M4, exceto no que respeita às substâncias indicadas no quadro 1, cujas concentrações são quatro vezes inferiores às do meio M4. Encontra-se em preparação um artigo sobre o meio M7 (Elenndt, comunicação pessoal). A solução de ensaio não deve ser preparada em conformidade com as indicações de Elenndt e Bias (1990), dado as concentrações de  $\text{Na-SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  apresentadas para a preparação das soluções-mãe não serem adequadas.

### Preparação do meio M7

13. Cada solução-mãe (I) é preparada individualmente, sendo preparada uma solução-mãe combinada (II) a partir dessas soluções (I) (ver o quadro 1). O meio M7 é preparado diluindo para 1 l, com água desionizada, 50 ml da solução-mãe combinada (II) e as quantidades de cada solução-mãe de macronutrientes indicadas no quadro 2. Prepara-se uma solução-mãe de vitaminas juntando três vitaminas a água desionizada, como indicado no quadro 3; adiciona-se 0,1 ml da solução-mãe combinada de vitaminas ao meio M7 final pouco antes da utilização (a solução-mãe de vitaminas é armazenada por congelamento, em pequenas alíquotas). O meio é arejado e estabilizado.

### REFERÊNCIAS

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Editado por M. Streloke e H.Köpp. Berlim, 1995.

Quadro 1

### Soluções-mãe de elementos vestigiais para os meios M4 e M7

Soluções-mãe (I)	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Para preparar a solução-mãe combinada (II), misturar as seguintes quantidades (ml) de soluções-mãe (I) e diluir para 1 litro com água desionizada		Concentrações finais nas soluções de ensaio (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
$\text{H}_3\text{BO}_3$ (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
$\text{LiCl}$ (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
$\text{RbCl}$ (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
$\text{NaBr}$ (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$\text{ZnCl}_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
$\text{KI}$	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
$\text{NH}_4\text{VO}_3$	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Estas substâncias são diferentes nos meios M4 e M7, como se indica no quadro.

(2) Estas soluções são preparadas individualmente, misturadas e colocadas de imediato numa autoclave.

Quadro 2

**Soluções-mãe de macronutrientes para os meios M4 e M7**

	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Quantidade de soluções-mãe de macronutrientes adicionada para preparar os meios M4 e M7 (ml/l)	Concentrações finais nas soluções de ensaio M4 e M7 (mg/l)
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	293 800	1,0	293,8
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO <sub>3</sub>	64 800	1,0	64,8
NaSiO <sub>3</sub> · 9 H <sub>2</sub> O	50 000	0,2	10,0
NaNO <sub>3</sub>	2 740	0,1	0,274
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 430	0,1	0,143
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 840	0,1	0,184

Quadro 3

**Soluções-mãe de vitaminas para os meios M4 e M7. As três soluções de vitaminas são combinadas para originar uma única solução-mãe.**

	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Quantidade de solução-mãe de vitaminas adicionada para preparar os meios M4 e M7 (ml/l)	Concentrações finais nas soluções de ensaio M4 e M7 (mg/l)
Cloridrato de tiamina	750	0,1	0,075
Cianocobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotina	7,5	0,1	0,00075

## REFERÊNCIAS

Elendt B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P., Bias W.-R. (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

## Apêndice 3

## PREPARAÇÃO DOS SEDIMENTOS FORMULADOS

**Composição dos sedimentos**

A composição dos sedimentos formulados deve ser a seguinte:

Componente	Características	% da massa seca dos sedimentos
Turfa	Turfa de <i>Sphagnum</i> , com pH tão próximo quanto possível do intervalo 5,5-6,0, sem restos visíveis de plantas, finamente moída (granulometria $\leq 1$ mm) e seca ao ar	4-5
Areia quartzítica	Granulometria: > 50 % das partículas de granulometria na gama 50-200 $\mu\text{m}$	75-76
Argila caulínica	Teor de caulinite $\geq 30$ %	20
Carbono orgânico	Ajustado por adição de turfa e areia	2 ( $\pm 0,5$ )
Carbonato de cálcio	$\text{CaCO}_3$ pulverizado quimicamente puro	0,05-0,1
Água	Condutividade $\leq 10$ $\mu\text{S/cm}$	30-50

**Preparação**

A turfa é seca ao ar e moída até se obter um pó fino. Prepara-se uma suspensão da quantidade necessária de turfa pulverizada em água desionizada, por recurso a um dispositivo de homogeneização de alta eficiência. O pH desta suspensão é ajustado para  $5,5 \pm 0,5$  com  $\text{CaCO}_3$ . A suspensão é acondicionada durante, pelo menos, dois dias, com agitação ligeira a  $20 \pm 2$  °C, para estabilizar o pH e estabelecer um perfil microbiano estável. Findo este período, determina-se novamente o pH, que deve ser de  $6,0 \pm 0,5$ . A suspensão de turfa é então misturada com os outros componentes (areia e argila caulínica) e água desionizada, de forma a obter sedimentos homogêneos com um teor de água da ordem de 30 %-50 % da massa seca dos sedimentos. O pH da mistura final é determinado uma vez mais e, se necessário, ajustado para  $6,5-7,5$  com  $\text{CaCO}_3$ . São colhidas amostras dos sedimentos para determinar o resíduo seco e o teor de carbono orgânico. Recomenda-se que, antes de ser utilizados num ensaio de toxicidade em quironómídeos, os sedimentos formulados sejam acondicionados durante sete dias em condições idênticas às do ensaio subsequente.

**Armazenagem**

Os componentes secos para a preparação dos sedimentos artificiais podem ser armazenados num local seco e fresco, à temperatura ambiente. Os sedimentos formulados (húmidos) não devem ser armazenados antes da sua utilização nos ensaios. Devem ser utilizados imediatamente após o período de acondicionamento de sete dias que conclui a sua preparação.

**REFERÊNCIAS**

Capítulo C.8 deste anexo: Toxicidade em relação às minhocas.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (*Oligochaeta*) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

## Apêndice 4

## Características químicas de uma água de diluição adequada

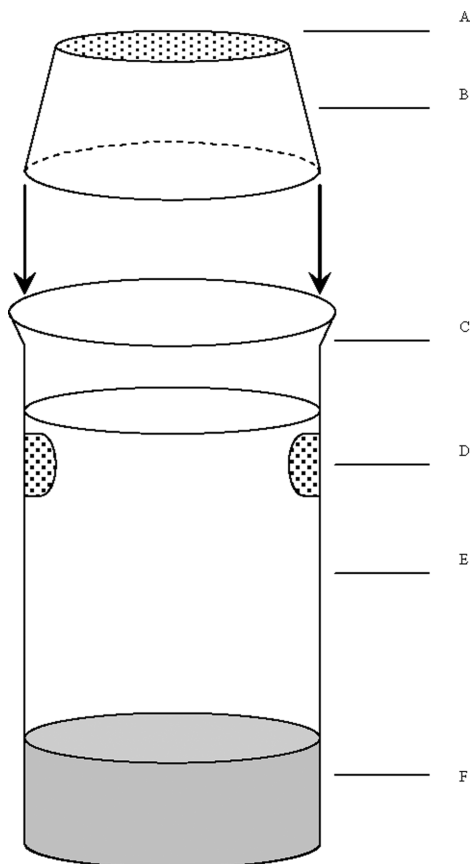
Substância	Concentrações
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amoníaco não ionizado	< 1 µg/l
Dureza expressa em CaCO <sub>3</sub>	< 400 mg/l (*)
Cloro residual	< 10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	< 50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados e dos bifenilos policlorados, totais	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

(\*) Contudo, caso se suspeite da existência de uma interação entre os iões responsáveis pela dureza e a substância em estudo, deve utilizar-se uma água mais macia (nesse caso, o meio Elendt M4 não pode ser utilizado).

## Apêndice 5

**Orientações para a monitorização da emergência das larvas de quironómídeos**

Os copos de ensaio são munidos de armadilhas de emergência. Estas armadilhas são necessárias a partir do vigésimo dia, até ao final do ensaio. A título de exemplo, pode utilizar-se o dispositivo abaixo ilustrado:



- |                               |   |
|-------------------------------|---|
| A: tela de nylon              | D: aberturas recobertas, para renovação da água |
| B: copo de plástico invertido | E: água   |
| C: copo de exposição sem bico | F: sedimentos                                   |

### C.28. ENSAIO DE TOXICIDADE EM QUIRONÓMÍDEOS NUM SISTEMA SEDIMENTOS-ÁGUA COM ÁGUA ENRIQUECIDA

#### INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 219 da OCDE (2004). Foi concebido para avaliar os efeitos nas larvas dos dípteros de água doce *Chironomus* sp., que vivem nos sedimentos, de uma exposição prolongada a determinados produtos químicos. Baseia-se principalmente nas orientações da BBA, utilizando um sistema de ensaio sedimentos-água num cenário de exposição com solo artificial e coluna de água (1). Tem também em conta os atuais protocolos de ensaios de toxicidade para as espécies *Chironomus riparius* e *Chironomus tentans* que foram desenvolvidos na Europa (1)(2)(3) e na América do Norte (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) e foram sujeitos a um ensaio interlaboratorial (1)(6)(9). Podem também utilizar-se outras espécies de quironómídeos bem documentadas, como a *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).
2. O cenário de exposição utilizado neste método de ensaio passa pelo enriquecimento da água na substância em estudo. A seleção do cenário de exposição adequado depende da finalidade do ensaio. O cenário de exposição na água, que envolve o enriquecimento da coluna de água na substância em estudo, tem por objetivo simular as perdas por dispersão na aplicação de pesticidas e abrange o pico de concentrações inicial na água dos poros. É também útil para outros tipos de exposições (incluindo o derrame de produtos químicos), com exceção dos processos de acumulação mais demorados do que o período do ensaio.

3. As substâncias a ensaiar com organismos que vivem nos sedimentos persistem, em geral, neste compartimento durante longos períodos. A exposição dos referidos organismos pode ter lugar por várias vias. A importância relativa de cada via de exposição, bem como o tempo de contribuição de cada uma delas para os efeitos tóxicos globais, depende das propriedades físico-químicas do produto químico em causa. No caso de substâncias fortemente adsorventes (por exemplo, com  $\log K_{ow} > 5$ ) ou de substâncias ligadas aos sedimentos por ligações covalentes, a ingestão de alimentos contaminados pode constituir uma via de exposição significativa. Para não subestimar a toxicidade das substâncias altamente lipófilas, pode ponderar-se a utilização de alimentos adicionados aos sedimentos antes da aplicação da substância em estudo. De forma a ter em conta todas as vias de exposição potenciais, o presente método de ensaio focaliza-se na exposição a longo prazo. A duração do ensaio é de 20 a 28 dias para *C. riparius* e *C. yoshimatsui* e de 28 a 65 dias para *C. tentans*. Se forem necessários dados a curto prazo para uma finalidade específica (por exemplo, para investigar os efeitos de um produto químico instável), é possível utilizar replicados adicionais a remover após de dez dias.
4. Os parâmetros medidos são o número total de indivíduos adultos emergidos e o tempo necessário para tal. Se forem necessários dados adicionais a curto prazo, recomenda-se que as determinações da sobrevivência e do crescimento das larvas apenas sejam efetuadas após um período de dez dias, recorrendo aos replicados adicionais que se justifiquem.
5. Recomenda-se a utilização de sedimentos formulados. Estes apresentam várias vantagens relativamente aos sedimentos naturais:
  - a variabilidade experimental é reduzida porque os sedimentos constituem uma matriz "normalizada" reprodutível, eliminando-se a necessidade de encontrar fontes de sedimentos limpos e não contaminados,
  - os ensaios podem ser iniciados em qualquer momento, eliminando-se assim a variabilidade sazonal dos sedimentos ensaiados, não havendo necessidade de pré-tratar os sedimentos para remover a fauna indígena; a utilização de sedimentos formulados reduz também os custos associados à colheita no terreno de quantidades suficientes de sedimentos para os ensaios de rotina,
  - a utilização de sedimentos formulados permite ainda efetuar comparações de toxicidade e classificar as substâncias em conformidade. Os dados de toxicidade obtidos a partir de ensaios com sedimentos naturais e artificiais mostraram-se comparáveis para vários produtos químicos (2).
6. São definidos no apêndice 1 alguns conceitos utilizados.

#### PRINCÍPIO DO MÉTODO

7. Expõe-se larvas de quironomídeos do primeiro estágio larvar a uma gama de concentrações da substância em estudo em sistemas sedimentos-água. O ensaio inicia-se com a colocação de larvas do primeiro estágio larvar nos copos de ensaio com o sistema sedimentos-água, adicionando-se posteriormente a substância em estudo à água. A emergência de quironomídeos e as respetivas taxas de desenvolvimento são medidas no final do ensaio. Se necessário, a sobrevivência e o peso das larvas podem também ser determinados decorridos 10 dias, utilizando os replicados adicionais que se justifiquem. Os dados são analisados por recurso a um modelo de regressão, de forma a estimar a concentração que causaria uma redução de x% na emergência, na sobrevivência ou no crescimento das larvas (por exemplo,  $CE_{15}$ ,  $CE_{50}$ , etc.), ou utilizando hipóteses estatísticas, para determinar a NOEC/LOEC. Este último método exige a comparação de valores que produzem efeitos com valores de controlo, por recurso a testes estatísticos.

#### INFORMAÇÕES SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

8. Devem ser conhecidas a solubilidade em água e a pressão de vapor da substância em estudo, bem como a partição nos sedimentos medida ou calculada e a estabilidade na água e nos sedimentos. Para a quantificação da substância em estudo na água sobrenadante, na água dos poros e nos sedimentos, deve dispor-se de um método analítico fiável, com exatidão e limite de deteção conhecidos e documentados. A fórmula estrutural e o grau de pureza da substância constituem igualmente informações úteis. O comportamento químico da substância em estudo (p. ex.: dissipação, degradação abiótica ou biótica, etc.) é também uma informação importante. Para mais orientações sobre o ensaio de substâncias cujas propriedades físico-químicas dificultam a realização dos ensaios, consultar a referência bibliográfica (12).

#### PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA

9. Pode testar-se periodicamente produtos químicos de referência com o objetivo de garantir a fiabilidade do protocolo e das condições de ensaio. As seguintes substâncias constituem exemplos de substâncias tóxicas de referência utilizadas com êxito em ensaios interlaboratoriais e em estudos de validação: lindano, trifluralina, pentaclorofenol, cloreto de cádmio e cloreto de potássio (1)(2)(5)(6)(13).

#### VALIDADE DO ENSAIO

10. Um ensaio é considerado válido se forem cumpridas as seguintes condições:
  - a emergência nos controlos deve ser de, pelo menos, 70 % no final do ensaio (1)(6),



- a emergência de indivíduos adultos das espécies *C. riparius* e *C. yoshimatsui* nos recipientes de controlo deve ocorrer 12 a 23 dias após a inserção destas espécies nos recipientes; no caso da *C. tentans*, é necessário um período de 20 a 65 dias,
- no final do ensaio, devem determinar-se o pH e a concentração de oxigénio dissolvido em cada recipiente. A concentração de oxigénio deve ser de, pelo menos, 60 % do valor da saturação com ar (VSA) à temperatura utilizada e o pH da água sobrenadante deve estar compreendido entre 6 e 9, em todos os recipientes de ensaio,
- a temperatura da água não deve variar mais de  $\pm 1,0$  °C. Esta temperatura pode ser controlada numa sala isotérmica, caso em que a temperatura ambiente deve ser confirmada a intervalos adequados.

#### DESCRIÇÃO DO MÉTODO

##### Recipientes de ensaio

11. O estudo é realizado em copos de vidro de 600 ml, com 8 cm de diâmetro. Podem utilizar-se outros recipientes, devendo contudo assegurar-se uma espessura adequada da água sobrenadante e dos sedimentos. A superfície dos sedimentos deve proporcionar 2 a 3 cm<sup>2</sup> por cada larva. O rácio entre a espessura da camada de sedimentos e a espessura da água sobrenadante deve ser de 1:4. Os recipientes de ensaio e o restante equipamento que entre em contacto com o sistema de ensaio devem ser exclusivamente de vidro ou de outro material quimicamente inerte (p. ex., Teflon).

##### Seleção das espécies

12. A espécie a utilizar de preferência no ensaio é a *Chironomus riparius*. A espécie *Chironomus tentans* também é adequada, mas é mais difícil de manipular e exige um período de ensaio mais longo. Pode igualmente utilizar-se a *Chironomus yoshimatsui*. O apêndice 2 apresenta informações sobre os métodos de cultura de *Chironomus riparius*. Estão também disponíveis informações sobre as condições de cultura das espécies *Chironomus tentans* (4) e *Chironomus yoshimatsui* (11). A identidade das espécies deve ser confirmada antes do ensaio, exceto no caso de organismos provenientes de uma cultura interna do laboratório.

##### Sedimentos

13. Devem ser utilizados, de preferência, sedimentos formulados (reconstituídos, artificiais ou sintéticos). Contudo, se forem utilizados sedimentos naturais, estes devem ser caracterizados (pelo menos pH e teor de carbono orgânico, recomendando-se a determinação de outros parâmetros, tais como a razão C/N e a granulometria) e devem estar isentos de qualquer contaminação e de outros organismos que possam competir com os quironómídeos ou consumi-los. Recomenda-se igualmente que, antes de serem utilizados num ensaio de toxicidade em quironómídeos, os sedimentos naturais sejam acondicionados durante sete dias em condições semelhantes às do ensaio subsequente. Recomenda-se que sejam utilizados no presente ensaio (1)(15)(16) sedimentos formulados com a seguinte composição, baseada na do solo artificial utilizado no método C.8 (14):
  - a) 4-5 % (massa seca) de turfa: pH tão próximo quanto possível do intervalo 5,5-6,0; é importante utilizar turfa em pó, finamente moída (granulometria das partículas  $\leq 1$  mm), unicamente seca ao ar;
  - b) 20 % (massa seca) de argila caulínica, de preferência com teor de caulinite superior a 30 %;
  - c) 75-76 % (massa seca) de areia quartzítica, com predominância de areia fina com mais de 50 % de partículas de granulometria compreendida entre 50 e 200  $\mu$ m;
  - d) a quantidade de água desionizada necessária para que o teor de humidade da mistura final se situe na gama 30-50 %;
  - e) a quantidade de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) quimicamente puro necessária para ajustar o pH da mistura final dos sedimentos a  $7,0 \pm 0,5$ ;
  - f) teor de carbono orgânico da mistura final:  $2 \% \pm 0,5$  %, devendo ser ajustado por recurso a quantidades adequadas de turfa e areia, em conformidade com as alíneas a) e c).
14. As origens da turfa, da argila caulínica e da areia devem ser conhecidas. Deve verificar-se a ausência de contaminação química (p. ex., metais pesados, compostos organoclorados, compostos organofosforados, etc.) nos componentes dos sedimentos. No apêndice 3, apresenta-se um exemplo de preparação de sedimentos. Uma mistura de componentes secos também é aceitável caso se demonstre que, após a adição da água sobrenadante, não ocorre separação de componentes dos sedimentos (por exemplo, partículas de turfa flutuantes) e que a turfa ou os sedimentos estão suficientemente acondicionados.

### Água

- Qualquer água com as características químicas de uma água de diluição aceitável enunciadas nos apêndices 2 e 4 é adequada para o ensaio. Para a cultura e o ensaio, pode utilizar-se qualquer água adequada, água natural (superficial ou subterrânea), água reconstituída (ver o apêndice 2) ou água da rede de abastecimento desclorada, desde que os quironómídeos nela sobrevivam durante todo o período de cultura e de ensaio sem evidenciarem sinais de *stress*. No início do ensaio, o pH da água de ensaio deve estar compreendido entre 6 e 9 e a dureza total da água, expressa em CaCO<sub>3</sub>, não deve exceder 400 mg/l. No entanto, caso se suspeite de uma interação entre os iões responsáveis pela dureza e a substância em estudo, deve utilizar-se uma água de dureza inferior (nessa eventualidade, o meio Elendt M4 não pode ser utilizado). Deve utilizar-se o mesmo tipo de água em todo o estudo. As características de qualidade da água enumeradas no apêndice 4 devem ser determinadas pelo menos duas vezes por ano, ou sempre que se suspeite que tenham mudado significativamente.

### Soluções-mãe — água enriquecida

- As concentrações de ensaio são calculadas com base nas concentrações da água da coluna de água, ou seja, da água sobrenadante dos sedimentos. De um modo geral, as soluções de ensaio com as concentrações escolhidas são preparadas por diluição de uma solução-mãe. As soluções-mãe devem ser preparadas, de preferência, por dissolução da substância em estudo no meio de ensaio. Em alguns casos, pode ser necessária a utilização de solventes ou dispersantes para produzir uma solução-mãe com a concentração adequada. A acetona, o etanol, o metanol, os éteres mono e dimetilico do etilenoglicol, a dimetilformamida e o trietilenoglicol constituem exemplos de solventes que podem ser utilizados. No que respeita aos dispersantes, podem utilizar-se o Cremophor RH40, o Tween 80, a metilcelulose a 0,01 % e o HCO-40. A concentração do agente solubilizante no meio de ensaio final deve ser mínima (ou seja,  $\leq 0,1$  ml/l) e deve ser a mesma para todas as concentrações de exposição. Sempre que se utilize um agente solubilizante, este não deve apresentar efeitos significativos na sobrevivência das larvas de quironómídeos, nem efeitos adversos observáveis nas mesmas, a confirmar por meio de um controlo do solvente. No entanto, como se referiu acima, devem fazer-se todos os esforços para evitar utilizar tais produtos.

### PLANEAMENTO DO ENSAIO

- O planeamento do ensaio consiste na escolha do número e dos intervalos das concentrações de ensaio, do número de recipientes para cada concentração e do número de larvas por recipiente. Descreve-se de seguida o método de estimativa de pontos CE e do NOEC, bem como de realização de ensaios do limite. A análise por regressão linear é preferível à abordagem por testes de hipóteses.

#### *Análise por regressão linear*

- As concentrações testadas no ensaio deverão incluir as concentrações às quais se observam efeitos (por exemplo, CE<sub>15</sub> e CE<sub>50</sub>) e abranger a gama de concentrações para as quais o efeito da substância em estudo é significativo. De modo geral, é possível melhorar a exatidão e, em especial, a validade das estimativas das concentrações que produzem efeitos (CE<sub>x</sub>) se essas concentrações se situarem na gama de concentrações ensaiadas. Devem evitar-se extrapolações muito abaixo da concentração positiva mais baixa ou acima da concentração mais elevada. É útil efetuar um ensaio exploratório preliminar para a escolha da gama de concentrações a utilizar no ensaio (ver o ponto 27).
- Caso se pretenda estimar uma CE<sub>x</sub>, devem ser utilizados, pelo menos, cinco concentrações e três replicados de cada concentração. Em qualquer caso, para obter uma boa estimativa, é aconselhável ensaiar um número suficiente de concentrações. O fator entre as concentrações não deve ser superior a dois (salvo se a curva de resposta à dose tiver um declive reduzido). Pode reduzir-se o número de replicados de cada concentração se for aumentado o número de concentrações de ensaio com respostas diferentes. O aumento do número de replicados ou a redução dos intervalos entre concentrações intervalos produz, em geral, intervalos de confiança mais estreitos. Caso se pretenda estimar a sobrevivência e o crescimento das larvas a 10 dias, é necessário utilizar mais replicados.

#### *Estimativa do NOEC/LOEC*

- Caso se pretenda estimar o NOEC ou o LOEC, devem ensaiar-se cinco concentrações com, pelo menos, quatro replicados, não devendo o fator entre as concentrações ser superior a dois. O número de replicados deverá ser suficiente para garantir a possibilidade estatística de detetar de forma adequada uma diferença de 20 % relativamente à concentração de controlo, com um grau de significância de 5 % ( $p = 0,05$ ). No respeitante às taxas de desenvolvimento, é geralmente adequada uma análise de variância (ANOVA), como o teste de Dunnett ou o teste de Williams (17)(18)(19)(20). Quanto à taxa de emergência, podem utilizar-se o teste de Cochran-Armitage, o teste exato de Fisher (com a correção de Bonferroni) ou o teste de Mantel-Haentz.

#### *Ensaio do limite*

- Caso não sejam detetados efeitos no ensaio exploratório preliminar de seleção das concentrações, pode proceder-se a um ensaio do limite (uma concentração de ensaio e uma de controlo). O objetivo do ensaio do limite consiste em provar que as concentrações tóxicas da substância em estudo são superiores à concentração máxima ensaiada. No âmbito do presente método de ensaio, não é possível sugerir nenhuma concentração a recomendar; esse critério é deixado à apreciação das entidades regulamentadoras. Em geral, são necessários, pelo menos, seis replicados dos organismos expostos e de controlo. Deve comprovar-se existir a possibilidade estatística de detetar de forma adequada uma diferença de 20 % relativamente ao controlo, com um grau de significância de 5 % ( $p = 0,05$ ). No que respeita ao efeito nas taxas de desenvolvimento e na massa, o teste *t* é um método estatístico adequado se os dados cumprirem os requisitos do teste (normalidade e variâncias homogêneas). Se estes requisitos não forem preenchidos, pode utilizar-se um teste *t* de variância desigual ou um teste não paramétrico, como o de Wilcoxon-Mann-Whitney. No que respeita à taxa de emergência, o teste exato de Fisher é adequado.

## PROCEDIMENTO

**Condições de exposição***Preparação do sistema água enriquecida-sedimentos*

22. Coloca-se nos recipientes de ensaio quantidades adequadas de sedimentos formulados (ver os pontos 13-14 e o apêndice 3), de modo a formar uma camada com, pelo menos, 1,5 cm de espessura. Junta-se água numa espessura de 6 cm (ver o ponto 15). A razão entre a espessura da camada de sedimentos e a espessura da camada de água não deve exceder 1:4; a espessura da camada de sedimentos não deve exceder 3 cm. O sistema sedimentos-água deve ser sujeito a um arejamento ligeiro durante sete dias, antes da introdução dos organismos em estudo (ver o ponto 14 e o apêndice 3). Para evitar a separação de componentes dos sedimentos e a ressuspensão de materiais finos durante a criação da coluna de água, os sedimentos podem ser cobertos, enquanto a água é vertida, com um disco de plástico que se remove imediatamente depois. Podem também utilizar-se outros dispositivos.
23. Os recipientes de ensaio devem ser cobertos (por exemplo, com placas de vidro). Se necessário, o nível inicial de água pode ser repostado durante o ensaio, para compensar a evaporação. Para tal, deve utilizar-se água destilada ou desionizada, de modo a evitar a acumulação de sais.

*Introdução dos organismos em estudo*

24. Quatro a cinco dias antes da introdução dos organismos em estudo nos recipientes de ensaio, deve colher-se aglomerados de ovos das culturas e colocá-los em pequenos recipientes com o meio de cultura. Pode utilizar-se meio proveniente da cultura-mãe ou um meio recentemente preparado. Neste último caso, importa adicionar ao meio de cultura uma pequena quantidade de alimentos, como, por exemplo, algas verdes e/ou algumas gotas de filtrado de uma suspensão de alimento para peixes finamente moído (ver o apêndice 2). Apenas devem ser utilizados aglomerados de ovos de postura recente. Normalmente, as larvas começam a eclodir alguns dias após a postura dos ovos (2 a 3 dias, a 20 °C, no caso das *Chironomus riparius*, e 1 a 4 dias no caso das *Chironomus tentans*, a 23 °C, e das *Chironomus yoshimatsui*, a 25 °C); o crescimento das larvas ocorre em quatro estádios larvares, cada um com uma duração de 4 a 8 dias. Utilizar no ensaio larvas do primeiro estádio larvar (2-3 ou 1-4 dias após a eclosão). O estádio larvar dos insetos pode, eventualmente, ser verificado por exame da largura da cápsula cefálica (6).
25. Com o auxílio de uma pipeta embotada, coloca-se aleatoriamente vinte larvas do primeiro estádio larvar em cada recipiente de ensaio contendo os sedimentos e a água. O arejamento da água tem de ser suspenso durante a colocação das larvas nos recipientes de ensaio, assim permanecendo nas 24 horas subsequentes a esta operação (ver os pontos 24 e 32). Consoante o tipo de ensaio realizado (ver os pontos 19 e 20), o número de larvas por concentração deve ser, no mínimo, de 60, no caso de estimativas de pontos CE, e de 80, no caso das determinações de NOEC.
26. Vinte e quatro horas após a introdução das larvas, a coluna de água sobrenadante é enriquecida com a substância em estudo, retomando-se um arejamento ligeiro. Com o auxílio de uma pipeta, introduzem-se pequenos volumes da solução da substância em estudo abaixo da superfície da água. A água sobrenadante deve, em seguida, ser homogeneizada com cuidado, para não perturbar os sedimentos.

*Concentrações de ensaio*

27. Pode ser útil efetuar um ensaio exploratório para a determinação da gama de concentrações a utilizar no ensaio definitivo. Para o efeito, recorre-se a uma série de concentrações espaçadas da substância em estudo. Garantido que a densidade de quironómídeos por unidade de superfície seja idêntica à utilizada no ensaio definitivo, os quironómídeos são expostos a cada concentração da substância em estudo por um período que permita uma estimativa das concentrações de ensaio adequadas, não sendo necessários replicados.
28. As concentrações a utilizar no ensaio definitivo são decididas com base nos resultados do ensaio exploratório. Devem ser utilizadas pelo menos cinco concentrações, selecionadas do modo descrito nos pontos 18 a 20.

*Controlos*

29. Deve utilizar-se no ensaio um número adequado de recipientes de controlo sem a substância em estudo, mas com os sedimentos (ver os pontos 19-20). Caso se recorra a um solvente para a incorporação da substância em estudo (ver o ponto 16), deve efetuar-se um controlo utilizando sedimentos com solvente.

*Sistema de ensaio*

30. São utilizados sistemas estáticos. Em casos excecionais, pode utilizar-se sistemas semiestáticos ou sistemas de escoamento com renovação intermitente ou contínua da água sobrenadante, por exemplo, se as características de qualidade da água se tornarem inadequadas ao organismo em estudo ou afetarem o equilíbrio químico (isto é, se os teores de oxigénio dissolvido baixarem demasiado, se a concentração de produtos de excreção aumentar demasiado, se ocorrer lixiviação de minerais dos sedimentos que afete o pH e/ou dureza da água, etc.). Deve preferir-se, contudo, o recurso a outros métodos para melhorar a qualidade da água sobrenadante, como o arejamento, que é, em geral, suficiente.

#### Alimentação

31. É necessário alimentar as larvas, de preferência diariamente ou, no mínimo, três vezes por semana. Utilizar alimento para peixes (suspensão em água ou finamente moído, por exemplo, Tetra Min or Tetra-Phyll; ver pormenores no apêndice 2); a quantidade de 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg no caso de *C. yoshimatsui*) por larva e dia afigura-se adequada para as larvas jovens, nos primeiros 10 dias. Após este período, pode ser necessária uma quantidade ligeiramente superior; 0,5-1 mg por larva e dia deve bastar para o resto do ensaio. A ração alimentar deve ser reduzida a todos os organismos expostos e aos controlos caso se observe crescimento fúngico ou se verifique mortalidade nos controlos. Se não for possível impedir o crescimento fúngico, deve repetir-se o ensaio. Quando se estuda substâncias fortemente adsorventes (por exemplo, com  $\log K_{ow} > 5$ ) ou substâncias ligadas aos sedimentos por ligações covalentes, a quantidade de alimentos necessária para assegurar a sobrevivência e o crescimento natural dos organismos pode ser adicionada aos sedimentos formulados, antes do período de estabilização. Para esse fim, devem ser utilizados matérias vegetais em vez de alimentos para peixes; a título de exemplo, 0,5 % (massa seca) de folhas finamente moídas de espécies como a urtiga comum (*Urtica dioeca*), a amoreira (*Morus alba*), o trevo branco (*Trifolium repens*), o espinafre (*Spinacia oleracea*) ou outras matérias de origem vegetal (*Cerophyl* ou  $\alpha$ -celulose).

#### Condições de incubação

32. O arejamento ligeiro da água sobrenadante nos recipientes de ensaio deve iniciar-se, de preferência, 24 horas após a introdução das larvas, prosseguindo ao longo de todo o ensaio (deve evitar-se que a concentração de oxigénio dissolvido baixe para valores inferiores a 60 % do VSA). O arejamento é efetuado por intermédio de uma pipeta de Pasteur de vidro, fixada 2-3 cm acima da camada de sedimentos (caudal: uma ou poucas bolhas por segundo). No ensaio de produtos químicos voláteis, pode optar-se por não arejar o sistema sedimentos-água.
33. O ensaio é realizado a temperatura constante ( $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). No caso das espécies *C. tentans* e *C. yoshimatsui*, as temperaturas recomendadas são  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), respetivamente. Utiliza-se um período de irradiação de 16 horas, com uma intensidade luminosa de 500 a 1 000 lux.

#### Duração da exposição

34. A exposição começa com a introdução das larvas nos recipientes enriquecidos e nos recipientes de controlo. A duração máxima da exposição é de 28 dias para a *C. riparius* e a *C. yoshimatsui* e de 65 dias para a *C. tentans*. Se os insetos emergirem precocemente, pode pôr-se termo ao ensaio, no mínimo, cinco dias após a emergência do último indivíduo adulto nos recipientes de controlo.

### OBSERVAÇÕES

#### Emergência

35. Determina-se o tempo de desenvolvimento e o número total de insetos machos e fêmeas totalmente emergidos. Os machos são facilmente identificados pelas suas antenas plumosas.
36. Os recipientes de ensaio devem ser observados pelo menos três vezes por semana, a fim de apreciar visualmente qualquer comportamento anormal (por exemplo, saída dos sedimentos, natação anormal) em relação aos recipientes de controlo. Durante o período de emergência previsto, é necessário proceder à contagem diária dos insetos emergidos. O sexo e o número de insetos totalmente emergidos são registados diariamente. Após a identificação, removem-se os insetos dos recipientes. Quaisquer aglomerados de ovos postos antes do termo do ensaio devem ser registados e, de seguida, removidos, para evitar a reintrodução de larvas nos sedimentos. Regista-se também o número de ninfas visíveis que não emergiram. O apêndice 5 contém orientações sobre a mensuração da emergência.

#### Crescimento e sobrevivência

37. Se for necessário obter dados sobre a sobrevivência e o crescimento das larvas em dez dias, deve prever-se recipientes de ensaio suplementares desde o início, para que possam ser utilizados posteriormente. Os sedimentos destes recipientes são passados por um crivo com abertura de malha de 250  $\mu\text{m}$ , para reter as larvas. Os critérios de morte são a imobilidade e a ausência de reação a estímulos mecânicos. As larvas não recuperadas devem também ser contadas como mortas (as larvas que morreram no início do ensaio podem ter sido degradadas por micróbios). Determina-se a massa seca, isenta de cinzas, de larvas sobreviventes em cada recipiente de ensaio, calculando-se a massa seca média por recipiente. É útil determinar o estágio larvar das larvas sobreviventes; para tal, pode recorrer-se à medição da largura da cápsula cefálica de cada indivíduo.

### Determinações analíticas

#### Concentração da substância em estudo

38. No início (de preferência uma hora após a aplicação da substância) e no final do ensaio, é necessário analisar, no mínimo, amostras da água sobrenadante, da água dos poros e dos sedimentos correspondentes à concentração mais elevada e a uma concentração inferior. Estas determinações da concentração da substância em estudo proporcionam informações sobre o comportamento e/ou a partição da mesma no sistema água-sedimentos. A colheita de amostras dos sedimentos no início do ensaio pode influenciar o sistema (por exemplo, remoção

de larvas), pelo que devem ser utilizados recipientes de ensaio adicionais para a realização das determinações analíticas no início e durante o ensaio, se pertinente (ver o ponto 39). Pode não ser necessário efetuar medições nos sedimentos, caso a partição da substância em estudo entre a água e os sedimentos tenha sido claramente determinada num estudo em condições comparáveis (por exemplo, coeficiente de partição sedimentos/água, tipo de aplicação, teor de carbono orgânico dos sedimentos).

39. Quando se efetua medições intermédias (por exemplo, no 7.º dia) e a análise necessita de amostras grandes que não podem ser colhidas dos recipientes de ensaio sem influenciar o sistema em estudo, as determinações analíticas devem ser realizadas com amostras colhidas de recipientes de ensaio suplementares tratados da mesma forma (incluindo a presença dos organismos em estudo), mas que não são alvo de observações biológicas.
40. A centrifugação a cerca de 10 000 g e 4 °C, durante 30 minutos, é o procedimento recomendado para isolar a água intersticial. No entanto, caso se demonstre que a substância em estudo não é adsorvida aos filtros, a filtragem também é aceitável. Em alguns casos, se a amostra for demasiado pequena, poderá não ser possível analisar concentrações na água dos poros.

#### *Parâmetros físico-químicos*

41. O pH, o teor de oxigénio dissolvido na água e a temperatura dos recipientes de ensaio devem ser medidos de forma adequada (ver o ponto 10). A dureza e o ião amónio devem ser medidos nos recipientes de controlo e num recipiente de ensaio com a concentração mais elevada, no início e no final do ensaio.

#### DADOS E RELATÓRIOS

##### *Tratamento dos resultados*

42. O objetivo deste ensaio consiste em determinar o efeito da substância em estudo nas taxas de desenvolvimento e no número total de insetos machos e fêmeas totalmente emergidos ou, no caso dos ensaios de 10 dias, os efeitos na sobrevivência e no peso das larvas. Se não houver indicação de sensibilidades estatisticamente diferentes entre os sexos, os resultados relativos aos machos e às fêmeas podem ser agrupados para efeitos de análise estatística. As diferenças de sensibilidade entre os sexos podem ser avaliadas estatisticamente, por exemplo, recorrendo a um ensaio de tabela de contingência  $\chi^2$ -r x 2. Se necessário, determina-se a sobrevivência das larvas e a massa seca por recipiente após 10 dias.
43. As concentrações com efeitos, expressas em relação à água sobrenadante, são calculadas de preferência a partir das concentrações medidas nos sedimentos no início do ensaio (ver o ponto 38).
44. Para efetuar uma estimativa pontual do valor CE<sub>50</sub> ou de qualquer valor CE<sub>x</sub>, podem equiparar-se os dados estatísticos por recipiente aos de ensaios idênticos reais. No cálculo de um intervalo de confiança para qualquer valor CE<sub>x</sub>, importa ter em conta a variabilidade entre recipientes, ou deve demonstrar-se que essa variabilidade é tão reduzida que pode ser ignorada. Se o modelo for ajustado pelo método dos mínimos quadrados, deve aplicar-se uma transformação aos dados estatísticos por recipiente, para melhorar a homogeneidade da variância. Contudo, os valores de CE<sub>x</sub> só devem ser calculados após retransformação da resposta no valor original.
45. Se a análise estatística tiver por objetivo determinar o NOEC/LOEC utilizando hipóteses estatísticas, importa ter em conta a variabilidade entre recipientes, por exemplo, aplicando um método ANOVA hierarquizado. Se não se verificarem os pressupostos comuns do método ANOVA, testes mais robustos podem constituir uma alternativa adequada (21).

##### *Taxa de emergência*

46. As taxas de emergência são dados de "tudo ou nada", que podem ser analisados através de um teste de Cochran-Armitage aplicado de forma regressiva, nos casos em que se prevê uma relação monótona entre a dose fornecida e a resposta e os dados são compatíveis com a previsão. Caso contrário, pode recorrer-se a um teste exato de Fisher ou a um teste de Mantel-Haentz com valores p ajustados segundo o método de Bonferroni-Holm. Se, para a mesma concentração, houver indícios de uma maior variabilidade entre replicados do que a sugerida por uma distribuição binomial (frequentemente referida como variação "extrabinomial"), deve utilizar-se um teste exato de Fisher ou um teste de Cochran-Armitage robusto, como proposto na referência 21.
47. Determina-se a soma dos insetos emergidos por recipiente, ne, que é seguidamente dividida pelo número de larvas nele introduzidas, na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

em que:

ER = Taxa de emergência

$n_e$  = Número de insetos emergidos no recipiente

$n_a$  = Número de larvas introduzidas no recipiente

48. Uma alternativa mais adequada a amostras grandes, quando se regista variância extrabinomial, consiste em considerar a taxa de emergência uma resposta contínua e aplicar procedimentos como o teste de William, caso se preveja uma relação monótona entre a dose fornecida e a resposta, compatível com os dados de taxa de emergência em causa. Por seu turno, o teste de Dunnett é adequado aos casos em que não se regista uma relação monótona. Neste contexto, uma amostra "grande" é definida como aquela em que o número total de insetos emergidos e não emergidos é superior a cinco por replicado (recipiente).
49. A aplicação de métodos ANOVA implica que os valores de taxa de emergência sejam sujeitos a uma transformação de arco-seno da raiz quadrada ou a uma transformação de Tukey-Freeman, de forma a obter uma distribuição aproximadamente normal e uniformizar as variâncias. Os testes de Cochran-Armitage, exato de Fisher (Bonferroni) e Mantel-Haentzel podem ser aplicados quando se utilizam frequências absolutas. A transformação de arco-seno da raiz quadrada consiste em calcular o inverso do seno ( $\sin^{-1}$ ) da raiz quadrada do valor da taxa de emergência.
50. No respeitante às taxas de emergência, os valores de  $CE_x$  são calculados por análise de regressão — por exemplo, por recurso aos modelos *probit* (22), *logit* ou Weibull ou a programas informáticos comerciais adequados). Em caso de fracasso da análise de regressão (por exemplo, se o número de respostas parciais for inferior a dois), utilizam-se outros métodos não paramétricos, como a média móvel ou a simples interpolação.

#### Taxa de desenvolvimento

51. O tempo médio de desenvolvimento representa o tempo médio decorrido entre a introdução das larvas (dia 0 do ensaio) e a emergência da coorte experimental de insetos (para o cálculo do tempo de desenvolvimento real, é necessário ter em conta a idade das larvas no momento da introdução). A taxa de desenvolvimento é o inverso do tempo de desenvolvimento (unidade: 1/dia) e representa a quantidade de desenvolvimento larvar que ocorre por dia. A taxa de desenvolvimento é o parâmetro preferido para a avaliação destes estudos de toxicidade dos sedimentos, dado que a sua variância é mais baixa que a do tempo de desenvolvimento, sendo também mais homogénea e mais próxima da distribuição normal. Os testes paramétricos mais potentes estão mais adaptados à taxa de desenvolvimento do que ao tempo de desenvolvimento. Considerando a taxa de desenvolvimento uma resposta contínua, os valores de  $CE_x$  podem ser estimados por recurso a uma análise de regressão — por exemplo, como descrito em 23 e 24.
52. No contexto dos testes estatísticos que se seguem, considera-se que o número de insetos observado no dia de inspeção  $x$  emergiu no ponto médio do intervalo de tempo compreendido entre o dia  $x$  e o dia  $x-d$  ( $d$  = duração do intervalo de inspeção, em geral 1 dia). A taxa de desenvolvimento média por recipiente (é calculada com base nas seguintes equações:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

em que:

- $\bar{x}$ : Taxa de desenvolvimento média por recipiente
- $i$ : Índice do intervalo de inspeção
- $m$ : Número máximo de intervalos de inspeção
- $f_i$ : Número de insetos emergidos no intervalo de inspeção  $i$
- $n_e$ : Número de insetos emergidos no final do ensaio ( $= \sum f_i$ )
- $x_i$ : Taxa de desenvolvimento dos insetos emergidos no intervalo  $i$

$$x_i = 1 / \left( \text{day}_i - \frac{1}{2} \right)$$

em que:

- $\text{day}_i$ : Dia de inspeção (n.º de dias decorridos desde a introdução dos organismos)
- $d_i$ : Duração do intervalo de inspeção  $i$  (dias, normalmente 1 dia)

#### Relatório dos ensaios

53. O relatório dos ensaios deve incluir, no mínimo, as seguintes informações:

##### Substância em estudo:

- natureza física e, quando pertinente, propriedades físico-químicas (solubilidade na água, pressão de vapor, coeficiente de partição no solo — ou nos sedimentos, se disponível —, estabilidade em água, etc.),
- dados de identificação química (denominação comum, denominação química, fórmula estrutural, número CAS, etc.), incluindo o grau de pureza e o método analítico de quantificação da substância.

*Espécies utilizadas nos ensaios:*

- animais: espécie, nome científico, origem dos organismos e condições de reprodução,
- informações sobre o manuseamento dos aglomerados de ovos e das larvas,
- idade dos animais quando introduzidos nos recipientes de ensaio.

*Condições experimentais:*

- sedimentos utilizados, isto é, de origem natural ou formulados,
- no caso dos sedimentos naturais, localização e descrição do local de colheita, incluindo, se possível, o historial de contaminação; características: pH, teor de carbono orgânico, razão C/N e granulometria (se pertinente),
- preparação dos sedimentos formulados: ingredientes e características (teor de carbono orgânico, pH, humidade, etc., no início dos ensaios),
- preparação da água para os ensaios, caso seja utilizada água reconstituída, e respetivas características (concentração de oxigénio, pH, condutividade, dureza, etc., no início dos ensaios);
- espessura dos sedimentos e da água sobrenadante,
- volume de água sobrenadante e de água dos poros; massa do sedimento húmido com e sem a água dos poros,
- recipientes de ensaio (material e dimensões),
- método de preparação das soluções-mãe e concentrações de ensaio,
- aplicação da substância em estudo: concentrações de ensaio utilizadas, número de replicados e solvente utilizado, se for o caso,
- condições de incubação: temperatura, ciclo de luz e intensidade luminosa, arejamento (frequência e intensidade),
- informações pormenorizadas sobre a alimentação dos organismos, incluindo o tipo de alimentos, a preparação, a quantidade e o regime alimentar.

*Resultados:*

- concentrações de ensaio nominais, concentrações de ensaio medidas e resultados de todas as análises efetuadas para determinar a concentração da substância em estudo nos recipientes de ensaio,
- qualidade da água nos recipientes de ensaio (pH, temperatura, oxigénio dissolvido, dureza e teor de ião amónio),
- renovação da água evaporada nos ensaios, se for o caso,
- número de insetos machos e fêmeas emergidos por recipiente e dia,
- número de larvas que não originaram insetos, por recipiente,
- massa seca média de larvas por recipiente e, se for caso disso, por estágio larvar,
- percentagem de emergência por replicado e por concentração de ensaio (machos e fêmeas no seu conjunto),
- taxa média de desenvolvimento de insetos totalmente emergidos por replicado e por concentração de ensaio (machos e fêmeas no seu conjunto),
- estimativas de parâmetros de toxicidade, como, por exemplo,  $CE_x$  (e os intervalos de confiança associados), NOEC e/ou LOEC, e métodos estatísticos utilizados para a determinação dos mesmos,
- discussão dos resultados, incluindo qualquer influência nos resultados do ensaio decorrente de alterações efetuadas ao presente método de ensaio.

## REFERÊNCIAS:

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Editado por M. Streløkke e H. Köpp. Berlim, 1995.
- (2) Fleming R. *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. Agosto de 1994. WRC, Reino Unido.
- (3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. WOSTA Workshop realizado nos Países Baixos.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. p. 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International. West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. Dezembro de 1997.
- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Segunda edição. EPA 600/R-99/064. Março de 2000. Revisão da primeira edição, de junho de 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., Kirby R.S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontário, Canadá.
- (10) Sugaya Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. *Jp. J. Sanit. Zool.* 48 (4): 345-350.
- (11) Kawai K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). *Jp. J. Sanit. Zool.* 37(1): 47-57.
- (12) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. Setembro de 1995.
- (14) Capítulo C.8 deste anexo: Toxicidade em relação às minhocas.
- (15) Suedel B.C., Rodgers J.H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1163-1175.
- (16) Naylor C., Rodrigues C. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere* 31: 3291-3303.
- (17) Dunnett C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121.



- 
- (18) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- (19) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
- (20) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510-531.
- (21) Rao J.N.K., Scott A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48:577-585.
- (22) Christensen E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213-221.
- (23) Bruce, Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494.
- (24) Slob W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.
-

*Apêndice 1*

## DEFINIÇÕES

No âmbito do presente método, aplica-se as seguintes definições:

**Sedimentos formulados** ou reconstituídos, artificiais ou sintéticos: mistura de matérias utilizadas para simular os componentes físicos de sedimentos naturais.

**Água sobrenadante**: água situada acima da superfície dos sedimentos, no recipiente de ensaio.

**Água intersticial** ou água dos poros: água que ocupa o espaço entre as partículas de sedimentos e de solo.

**Água enriquecida**: água utilizada no ensaio, à qual foi adicionada a substância em estudo.

**Produto químico em estudo**: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

---

## Apêndice 2

**Recomendações para a cultura de *Chironomus riparius***

1. As larvas de *Chironomus* podem ser criadas em caixas de cristalização ou recipientes de maiores dimensões. Espalha-se no fundo do recipiente areia quartzítica fina de modo a constituir uma camada fina com 5 a 10 mm de espessura. Verificou-se que o *kieselguhr* (p. ex. Merck 8117) é também um substrato adequado; neste caso, pode utilizar-se uma camada mais fina, da ordem de poucos milímetros. Adiciona-se de seguida uma coluna de vários centímetros de uma água adequada. Se necessário, os níveis de água podem ser repostos para compensar a evaporação e evitar a dessecação. A água pode ser substituída, se necessário. Deve efetuar-se um arejamento ligeiro. Os recipientes de criação das larvas devem ser mantidos em gaiolas adequadas, de forma a evitar fugas de adultos emergentes. A gaiola deve ser suficientemente grande (no mínimo, cerca de 30 x 30 x 30 cm), para permitir a enxameação dos adultos emergidos, sem o que poderá não ocorrer copulação.
2. As gaiolas devem ser mantidas à temperatura ambiente ou a uma temperatura constante de  $20 \pm 2$  °C, com um período de luminosidade (cerca de 1 000 lux) de 16 horas e oito horas de escuridão. Existem referências documentais de que um teor de humidade relativa do ar inferior a 60 % pode impedir a reprodução.

**Água de diluição**

3. Pode utilizar-se qualquer água natural ou reconstituída adequada. Utiliza-se em geral água de poços, água da rede de abastecimento desclorada e meios artificiais (por exemplo, meio Elendt M4 ou M7; ver abaixo). A água tem de ser arejada antes da utilização. Se necessário, a água das culturas pode ser renovada por vazamento ou sifonagem cuidadoso da água dos recipientes de cultura, para não destruir os tubos das larvas.

**Alimentação das larvas**

4. As larvas de *Chironomus* são alimentadas com cerca de 250 mg por recipiente e por dia de um alimento floculado para peixes (Tetra Min®, Tetra Phyll® ou outra marca semelhante). Os alimentos podem ser administrados na forma de um pó seco finamente moído ou de uma suspensão em água: adicionar 1,0 g de alimento floculado a 20 ml de água de diluição e misturar de modo a obter uma mistura homogénea. Esta preparação pode ser administrada ao caudal aproximado de 5 ml por recipiente e por dia (agitar antes da utilização). Pode administrar-se às larvas de idade superior uma maior quantidade de alimento.
5. A alimentação é ajustada em função da qualidade da água. Se o meio de cultura se tornar turvo, deve reduzir-se a alimentação. A administração de alimentos deve ser objeto de um registo minucioso. A escassez de alimentos causaria a migração das larvas para a coluna de água, enquanto uma alimentação demasiado rica aumentaria a atividade microbiana e reduziria a concentração de oxigénio. Ambas estas condições podem resultar numa redução das taxas de crescimento.
6. Ao preparar novos recipientes de cultura, podem também adicionar-se algumas células de algas verdes (por exemplo, *Scenedesmus subspicatus* e *Chlorella vulgaris*).

**Alimentação dos adultos emergidos**

7. Alguns experimentadores sugeriram que um tampão de algodão embebido numa solução saturada de sacarose pode servir de alimento para os adultos emergidos.

**Emergência**

8. À temperatura de  $20 \pm 2$  °C, os adultos começam a emergir dos recipientes de criação das larvas decorridos 13 a 15 dias. Os machos são facilmente distinguidos pelas suas antenas plumosas.

**Aglomerados de ovos**

9. Quando se encontrarem presentes adultos nas gaiolas de criação, deve verificar-se três vezes por semana se ocorre a deposição de aglomerados gelatinosos de ovos nos recipientes de criação das larvas. Se tal suceder, devem ser removidos com cuidado e ser transferidos para uma pequena cápsula com uma amostra da água de incubação. Os aglomerados de ovos são utilizados para iniciar novas culturas noutros recipientes (p. ex., 2-4 aglomerados de ovos por recipiente) ou em ensaios de toxicidade.
10. As larvas do primeiro estágio larvar devem eclodir decorridos 2-3 dias.

**Preparação de novos recipientes de cultura**

11. Quando as culturas estiverem estabelecidas, deverá ser possível preparar um novo recipiente de cultura de larvas por semana, ou com uma frequência menor (consoante os requisitos dos ensaios), removendo os recipientes mais antigos após a emergência dos insetos adultos. O recurso a este sistema permitirá obter um aprovisionamento regular de insetos adultos com uma gestão mínima.

**Preparação das soluções de ensaio M4 e M7**

12. O meio M4 foi descrito por Elenndt (1990). O meio M7 é preparado do mesmo modo que o M4, exceto no que respeita às substâncias indicadas no quadro 1, cujas concentrações são quatro vezes inferiores às do meio M4. Encontra-se em preparação um artigo sobre o meio M7 (Elenndt, comunicação pessoal). A solução de ensaio não deve ser preparada em conformidade com as indicações de Elenndt e Bias (1990), dado as concentrações de Na-SiO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O, NaNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> apresentadas para a preparação das soluções-mãe não serem adequadas.

**Preparação do meio M7**

13. Cada solução-mãe (I) é preparada individualmente, sendo preparada uma solução-mãe combinada (II) a partir dessas soluções (I) (ver o quadro 1). O meio M7 é preparado diluindo para 1 l, com água desionizada, 50 ml da solução-mãe combinada (II) e as quantidades de cada solução-mãe de macronutrientes indicadas no quadro 2. Prepara-se uma solução-mãe de vitaminas juntando três vitaminas a água desionizada, como indicado no quadro 3; adiciona-se 0,1 ml da solução-mãe combinada de vitaminas ao meio M7 final pouco antes da utilização (a solução-mãe de vitaminas é armazenada por congelação, em pequenas alíquotas). O meio é arejado e estabilizado.

Quadro 1

**Soluções-mãe de elementos vestigiais para os meios M4 e M7**

Soluções-mãe (I)	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Para preparar a solução-mãe combinada (II), misturar as seguintes quantidades (ml) de soluções-mãe (I) e diluir para 1 litro com água desionizada		Concentrações finais nas soluções de ensaio (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> <sup>(1)</sup>	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl <sup>(1)</sup>	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl <sup>(1)</sup>	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
SrCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr <sup>(1)</sup>	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl <sub>2</sub>	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

<sup>(1)</sup> Estas substâncias são diferentes nos meios M4 e M7, como se indica no quadro.

<sup>(2)</sup> Estas soluções são preparadas individualmente, misturadas e colocadas de imediato numa autoclave.

Quadro 2

**Soluções-mãe de macronutrientes para os meios M4 e M7**

	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Quantidade de soluções-mãe de macronutrientes adicionada para preparar os meios M4 e M7 (ml/l)	Concentrações finais nas soluções de ensaio M4 e M7 (mg/l)
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	293 800	1,0	293,8
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	246 600	0,5	123,3

	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Quantidade de soluções-mãe de macronutrientes adicionada para preparar os meios M4 e M7 (ml/l)	Concentrações finais nas soluções de ensaio M4 e M7 (mg/l)
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO <sub>3</sub>	64 800	1,0	64,8
NaSiO <sub>3</sub> · 9 H <sub>2</sub> O	50 000	0,2	10,0
NaNO <sub>3</sub>	2 740	0,1	0,274
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 430	0,1	0,143
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 840	0,1	0,184

Quadro 3

**Soluções-mãe de vitaminas para os meios M4 e M7**

As três soluções de vitaminas são combinadas para originar uma única solução-mãe.

	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Quantidade de solução-mãe de vitaminas adicionada para preparar os meios M4 e M7 (ml/l)	Concentrações finais nas soluções de ensaio M4 e M7 (mg/l)
Cloridrato de tiamina	750	0,1	0,075
Cianocobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotina	7,5	0,1	0,00075

## REFERÊNCIAS

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Editado por M. Strelke e H. Köpp. Berlim, 1995.

Elendt B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P., Bias W.-R. (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

## Apêndice 3

## PREPARAÇÃO DOS SEDIMENTOS FORMULADOS

**Composição dos sedimentos**

A composição dos sedimentos formulados deve ser a seguinte:

Componente	Características	% da massa seca dos sedimentos
Turfa	Turfa de <i>Sphagnum</i> , com pH tão próximo quanto possível do intervalo 5,5-6,0, sem restos visíveis de plantas, finamente moída (granulometria $\leq 1$ mm) e seca ao ar	4-5
Areia quartzítica	Granulometria: $> 50$ % das partículas de granulometria na gama 50-200 $\mu\text{m}$	75-76
Argila caulínica	Teor de caulinite $\geq 30$ %	20
Carbono orgânico	Ajustado por adição de turfa e areia	2 ( $\pm 0,5$ )
Carbonato de cálcio	$\text{CaCO}_3$ pulverizado quimicamente puro	0,05-0,1
Água	Condutividade $\leq 10$ $\mu\text{S/cm}$	30-50

**Preparação**

A turfa é seca ao ar e moída até se obter um pó fino. Prepara-se uma suspensão da quantidade necessária de turfa pulverizada em água desionizada, por recurso a um dispositivo de homogeneização de alta eficiência. O pH desta suspensão é ajustado para  $5,5 \pm 0,5$  com  $\text{CaCO}_3$ . A suspensão é acondicionada durante, pelo menos, dois dias, com agitação ligeira a  $20 \pm 2$  °C, para estabilizar o pH e estabelecer um perfil microbiano estável. Findo este período, determina-se novamente o pH, que deve ser de  $6,0 \pm 0,5$ . A suspensão de turfa é então misturada com os outros componentes (areia e argila caulínica) e água desionizada, de forma a obter sedimentos homogêneos com um teor de água da ordem de 30 %-50 % da massa seca dos sedimentos. O pH da mistura final é determinado uma vez mais e, se necessário, ajustado para  $6,5-7,5$  com  $\text{CaCO}_3$ . São colhidas amostras dos sedimentos para determinar o resíduo seco e o teor de carbono orgânico. Recomenda-se que, antes de ser utilizados num ensaio de toxicidade em quironómídeos, os sedimentos formulados sejam acondicionados durante sete dias em condições idênticas às do ensaio subsequente.

**Armazenagem**

Os componentes secos para a preparação dos sedimentos artificiais podem ser armazenados num local seco e fresco, à temperatura ambiente. Os sedimentos formulados (húmidos) não devem ser armazenados antes da sua utilização nos ensaios. Devem ser utilizados imediatamente após o período de acondicionamento de sete dias que conclui a sua preparação.

**REFERÊNCIAS:**

Capítulo C.8 deste anexo: Toxicidade em relação às minhocas.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludge-worms (*Oligochaeta*) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

## Apêndice 4

## Características químicas de uma água de diluição adequada

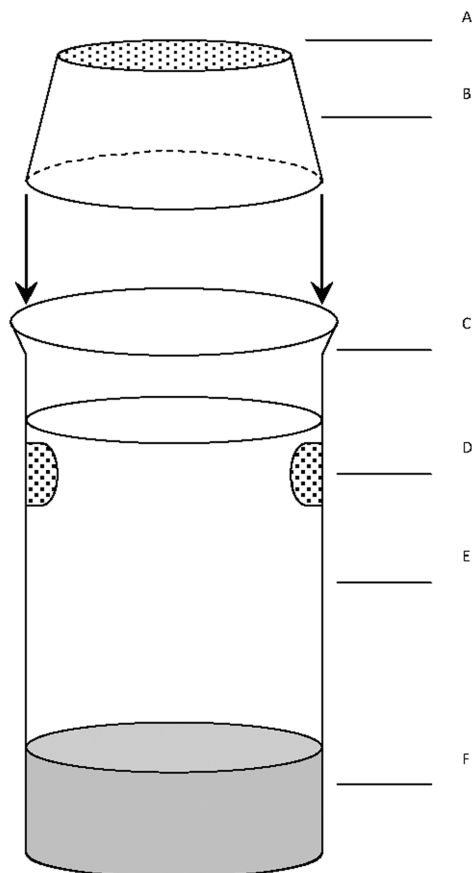
Substância	Concentrações
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amoníaco não ionizado	< 1 µg/l
Dureza expressa em CaCO <sub>3</sub>	< 400 mg/l (*)
Cloro residual	< 10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	< 50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados e dos bifenilos policlorados, totais	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

(\*) Contudo, caso se suspeite da existência de uma interação entre os iões responsáveis pela dureza e a substância em estudo, deve utilizar-se uma água mais macia (nesse caso, o meio Elendt M4 não pode ser utilizado).

## Apêndice 5

**Orientações para a monitorização da emergência das larvas de quironomídeos**

Os copos de ensaio são munidos de armadilhas de emergência. Estas armadilhas são necessárias a partir do vigésimo dia, até ao final do ensaio. A título de exemplo, pode utilizar-se o dispositivo abaixo ilustrado:



A: tela de nylon

B: copo de plástico invertido

C: copo de exposição sem bico

D: aberturas recobertas, para renovação da água

E: água

F: sedimentos

**C.29. BIODEGRADABILIDADE "FÁCIL" — CO<sub>2</sub> EM RECIPIENTES FECHADOS (Ensaio do espaço livre)****INTRODUÇÃO**

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 310 da OCDE (2006). Consiste num método exploratório para a avaliação da biodegradabilidade "fácil" dos produtos químicos e proporciona informações semelhantes às dos seis métodos de ensaio descritos no capítulo C.4 do presente anexo (A a F). Assim, um produto químico com resultados positivos neste método de ensaio pode ser considerado facilmente biodegradável e, por conseguinte, rapidamente degradável no ambiente.
2. O método do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (1), que se encontra bem implantado, baseia-se no ensaio original de Sturm (2) para a avaliação da biodegradabilidade de produtos químicos orgânicos através da medição do dióxido de carbono produzido pela ação microbiana e tem constituído, em geral, a primeira opção para o ensaio de produtos químicos pouco solúveis e de produtos químicos muito adsorventes. É também aplicado a produtos químicos solúveis (mas não voláteis), uma vez que a libertação de dióxido de carbono é frequentemente considerada a única prova inequívoca de atividade microbiana. A remoção do carbono orgânico dissolvido pode ter lugar por processos físico-químicos, como a adsorção, a volatilização, a precipitação e a hidrólise, bem como pela ação microbiana e por muitas reações não biológicas que consomem oxigénio; o CO<sub>2</sub> raramente é produzido a partir de produtos químicos orgânicos por via abiótica. Nos ensaios original e modificado de



- Sturm (1)(2), o CO<sub>2</sub> é removido da fase líquida para os recipientes de absorção por borbulhamento, no meio líquido, de ar tratado com o objetivo de remover o CO<sub>2</sub>; na versão de Larson (3)(4), é transferido do recipiente de reação para os absorventes introduzindo um fluxo de ar isento de CO<sub>2</sub> no espaço livre acima da superfície ("headspace"), com agitação contínua do recipiente de ensaio. O recipiente só é agitado no caso da modificação de Larson; a agitação é prescrita, apenas para produtos químicos insolúveis, na norma ISO 9439 (5) e na versão original dos EUA (6), que preconizam ambas o borbulhamento em vez da substituição do ar no espaço livre acima da superfície. Em outro método oficial da EPA — Estados Unidos da América (7) —, que se baseia no método de Gledhill (8), o recipiente de reação, sob agitação, encontra-se estanque e o CO<sub>2</sub> produzido é recolhido, diretamente a partir da fase gasosa, num coletor interno com uma substância alcalina, como nos respirómetros clássicos de Warburg/Barcroft.
3. Contudo, no caso da aplicação do ensaio de Sturm modificado a vários produtos químicos (9), demonstrou-se que, durante o ensaio, se acumula no meio carbono inorgânico (CI). Na degradação de 20 mg C/l de anilina, por exemplo, observou-se uma concentração de carbono inorgânico da ordem de 8 mg/l. Assim, a recolha de CO<sub>2</sub> em coletores com substâncias alcalinas traduz a quantidade real daquele gás produzida microbiologicamente nas fases intermédias da degradação. Por conseguinte, a exigência de mais de 60 % da produção máxima teórica de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>Te) ser recolhida nos dez dias imediatamente após ser alcançado um nível de 10 % de biodegradação ("período de dez dias"), para que um produto químico seja classificado de facilmente biodegradável, não é cumprida no caso de alguns produtos químicos, que teriam essa classificação utilizando como critério a remoção do carbono orgânico dissolvido (COD).
  4. Se a percentagem de degradação for inferior ao previsto, ter-se-á possivelmente acumulado carbono inorgânico na solução de ensaio. A biodegradabilidade pode, então, ser avaliada por recurso aos outros ensaios de biodegradabilidade "fácil".
  5. Outros inconvenientes do método de Sturm (complexidade, morosidade, propensão para a ocorrência de erros experimentais e impossibilidade de aplicação a produtos químicos voláteis) tinham já levado à procura de uma técnica com recipientes selados diversa da de Gledhill, sem fluxo de gás (10)(11). Boatman *et al.* (12) analisaram os métodos mais antigos e adotaram um sistema fechado com libertação de CO<sub>2</sub> no espaço livre no final da incubação, por acidificação do meio. O CO<sub>2</sub> foi determinado através da análise do carbono inorgânico por cromatografia em fase gasosa a partir de amostras colhidas automaticamente no espaço livre, sem ter em conta o carbono inorgânico dissolvido (CID) na fase líquida. Além disso, foram utilizados recipientes muito pequenos (20 ml), com apenas 10 ml de meio, o que causou problemas, por exemplo, ao adicionar as quantidades necessariamente muito reduzidas de produtos químicos insolúveis e/ou no caso da inexistência ou insuficiência, no meio inoculado, de microrganismos para a degradação dos produtos químicos em estudo.
  6. Essas dificuldades foram superadas pelos estudos independentes de Struijs e Stoltenkamp (13) e de Birch e Fletcher (14), sendo os destes últimos inspirados pela experiência dos autores com dispositivos utilizados em ensaios de biodegradação anaeróbia (15). No método dos primeiros (13), o CO<sub>2</sub> é determinado no espaço livre após acidificação e equilíbrio, enquanto no segundo método (14) é determinado o carbono inorgânico dissolvido das fases gasosa e líquida, sem tratamento; mais de 90 % do carbono inorgânico formado encontra-se na fase líquida. Ambos os métodos têm vantagens relativamente ao ensaio de Sturm, na medida em que o sistema de ensaio é mais compacto e mais gerível, podem estudar-se produtos químicos voláteis e evita-se a possibilidade de demoras na determinação do CO<sub>2</sub> produzido.
  7. Ambas as abordagens foram combinadas na norma ISO com a referência 16, que foi sujeita a um ensaio interlaboratorial (17) e constitui a base do presente método de ensaio. O método da EPA dos Estados Unidos da América (18) utiliza também as duas abordagens. Foram recomendados dois métodos de determinação do CO<sub>2</sub>, designadamente a determinação no espaço livre após acidificação (13) e a determinação do carbono inorgânico na fase líquida após adição de um agente alcalino em excesso. Este último método foi introduzido por Peterson, no decurso do ensaio interlaboratorial da CONCAWE (19) do presente método de espaço livre modificado para determinar biodegradabilidades intrínsecas. As alterações introduzidas na revisão de 1992 dos métodos do capítulo C.4 deste anexo, relativos à determinação da biodegradabilidade "fácil" (20), foram incorporadas no presente método de ensaio, pelo que, além disso, as condições (meio, duração, etc.) são as mesmas que as do ensaio de Sturm revisto (20). Birch e Fletcher (14) referiram ter obtido com este ensaio de espaço livre resultados muito semelhantes aos obtidos, para os mesmos produtos químicos, no ensaio interlaboratorial dos métodos de ensaio revistos promovido pela OCDE (21).

#### PRINCÍPIO DO MÉTODO

8. O produto químico em estudo, em geral na concentração de 20 mg C/l, que constitui a única fonte de carbono e energia, é incubado num tampão de sais minerais previamente inoculado com uma população mista de microrganismos. O ensaio é realizado em recipientes selados, com ar no espaço livre acima do líquido, que proporciona uma reserva de oxigénio para a biodegradação aeróbia. A libertação de CO<sub>2</sub> resultante da biodegradação aeróbia total do produto químico em estudo é determinada pela medição do excesso de carbono inorgânico produzido nos recipientes de ensaio relativamente ao produzido em recipientes de ensaio em branco que contém apenas o meio inoculado. A extensão da biodegradação é expressa em percentagem da produção máxima teórica de carbono inorgânico (CITE), com base na quantidade de produto químico em estudo, expressa em carbono orgânico, inicialmente adicionada.
9. Pode também determinar-se (20) a remoção de COD e/ou o grau de biodegradação primária do produto químico em estudo.

## INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

10. Para o cálculo da percentagem de degradação, é necessário conhecer o teor de carbono orgânico (% ponderal) do produto químico em estudo, quer a partir da sua estrutura química quer por análise. No caso dos produtos químicos voláteis, o conhecimento da constante da lei de Henry, por medição ou cálculo, é útil para determinar uma razão adequada entre o espaço livre e o volume de líquido. É útil dispor de informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo para os microrganismos, a fim de selecionar as concentrações de ensaio adequadas e para interpretar resultados de baixa biodegradabilidade: recomenda-se a realização de controlos de inibição, exceto se se souber que o produto químico não inibe a atividade microbiana (ver o ponto 24).

## APLICABILIDADE DO MÉTODO

11. O ensaio é aplicável a produtos químicos solúveis e insolúveis em água, embora deva assegurar-se uma boa dispersão do produto químico. Utilizando a proporção recomendada de 1:2 entre o espaço livre e o volume de líquido, podem utilizar-se produtos químicos voláteis com uma constante da lei de Henry não superior a 50 Pa.m<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>, dado que a percentagem do produto químico no espaço livre não excederá 1 % (13). Pode utilizar-se um volume menor de espaço livre no ensaio de produtos químicos mais voláteis, cuja biodisponibilidade possa ser um fator limitante, em especial se forem pouco solúveis em água. No entanto, os utilizadores devem assegurar que a razão entre o espaço livre e o volume de líquido, bem como a concentração do produto químico, proporcionam uma quantidade suficiente de oxigénio para permitir a biodegradação aeróbia completa, evitando, por exemplo, o recurso a uma concentração elevada de substrato e a um espaço livre reduzido. As referências (13) e (23) contêm orientações nesta matéria.

## PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA

12. A fim de verificar o procedimento, deve submeter-se a ensaio, em paralelo, uma substância de referência de biodegradabilidade conhecida. Para o efeito, a anilina, o benzoato de sódio e o etilenoglicol podem ser utilizados com produtos químicos solúveis em água, podendo utilizar-se o 1-octanol no caso de produtos químicos pouco solúveis (13). A biodegradação destes produtos químicos deve ser superior a 60 % do carbono inorgânico teórico, em 14 dias.

## REPRODUTIBILIDADE

13. No ensaio interlaboratorial do método, promovido pela ISO (17), foram obtidos os seguintes resultados utilizando as condições recomendadas, nomeadamente uma concentração do produto químico em estudo de 20 mg C/l.

Produto químico	Percentagem média de biodegradação (28 dias)	Coefficiente de variação (%)	Número de laboratórios
Anilina	90	16	17
1-Octanol	85	12	14

Com anilina, a variabilidade interna dos ensaios (indicador de replicabilidade) foi reduzida, não excedendo os coeficientes de variabilidade 5 % em quase todas as séries de ensaios. Nos dois casos em que a replicabilidade foi pior, a variabilidade mais elevada deveu-se provavelmente à elevada produção de carbono inorgânico nos ensaios em branco. Com 1-octanol, registou-se uma replicabilidade mais baixa, embora com variabilidade inferior a 10 % em 79 % das séries de ensaios. Esta maior variabilidade interna dos ensaios pode ter sido devida a erros de dosagem, dado que foi necessário injetar um pequeno volume (3 a 4 µl) de 1-octanol nos recipientes de ensaio selados. Obtém-se coeficientes de variação superiores quando se utilizam concentrações mais baixas do produto químico em estudo, nomeadamente inferiores a 10 mg C/l. Este problema pode ser parcialmente superado reduzindo a concentração de carbono inorgânico total (CIT) no inóculo.

14. Num ensaio interlaboratorial promovido pela UE (24) de cinco produtos químicos tensoativos adicionadas na concentração de 10 mg C/l, foram obtidos os seguintes resultados:

Produto químico	Percentagem média de biodegradação (28 dias)	Coefficiente de variação (%)	Número de laboratórios
Benzenossulfonato de tetrapropileno	17	45	10
Di-iso-octilssulfosuccinato (aniónico)	72	22	9
Cloreto de hexadeciltrimetil-amónio (*) (catiónico)	75	13	10

Produto químico	Percentagem média de biodegradação (28 dias)	Coefficiente de variação (%)	Número de laboratórios
(Etoxilato) <sub>9</sub> de isononilfenol (não iónico)	41	32	10
Amidopropil de coco-di-metil-hidroxissulfobetaina (anfotérico)	60	23	11

(\*) Adicionou-se SiO<sub>2</sub> para neutralizar a toxicidade.

Os resultados mostram que, de um modo geral, a variabilidade foi superior no caso dos tensoativos menos degradados. A variabilidade interna dos ensaios foi inferior a 15 % em mais de 90 % dos casos; o maior valor registado foi da ordem de 30 % a 40 %.

NOTA: Na sua maioria, os tensoativos não são espécies moleculares simples, mas misturas de isómeros, homólogos, etc., com tempos de degradação característicos diferentes e constantes cinéticas diferentes, que produzem curvas mal definidas e atenuadas. Poderá, portanto, não ser possível atingir o limiar de 60 % no período de 10 dias, embora cada espécie molecular ultrapasse esse valor em 10 dias se for ensaiada isoladamente. Este facto também pode ser observado com outras misturas complexas.

#### DESCRIÇÃO DO MÉTODO

##### Equipamento

15. Material corrente de laboratório, nomeadamente:

- a) frascos de soro de vidro, selados com rolhas de borracha butílica e cápsulas de alumínio. A capacidade recomendada é "125 ml", a que corresponde um volume total de cerca de 160 ml (neste caso, o volume de cada frasco deve ser comprovadamente de 160 ± 1 ml). Se os resultados satisfizerem as condições descritas nos pontos 66 e 67, pode utilizar-se recipientes de capacidade inferior;
- b) analisador de carbono ou outro instrumento (p. ex. cromatógrafo de gás) para a determinação do carbono inorgânico;
- c) seringas de elevada precisão para amostras gasosas e líquidas;
- d) agitador orbital num ambiente com controlo de temperatura;
- e) fonte de ar isento de CO<sub>2</sub> — este ar pode ser preparado fazendo passar uma corrente de ar por grânulos de cal sodada ou utilizando uma mistura gasosa com 80 % N<sub>2</sub>/20 % O<sub>2</sub> (opcional) (ver o ponto 28);
- f) dispositivo de filtração com membrana de porosidade 0,20-0,45 µm (opcional);
- g) analisador de carbono orgânico (opcional).

##### Reagentes

16. Utilizar reagentes de qualidade analítica em todo o processo.

##### Água

17. Deve utilizar-se água destilada ou desionizada com teor de carbono orgânico total não superior a 1 mg/l. Este valor não excede 5 % do teor de carbono orgânico inicial introduzido pela dose recomendada do produto químico em estudo.

##### Soluções-mãe para o meio de sais minerais

18. As soluções-mãe e o meio de sais minerais são semelhantes aos utilizados nos ensaios ISO 14593 (16) e C.4 ("Biodegradabilidade 'fácil'") (20). A utilização de uma concentração mais elevada de cloreto de amónio (2,0 g/l em vez de 0,5 g/l) só é necessária em casos muito excepcionais, por exemplo, se a concentração do produto químico em estudo exceder 40 mg de C/l. As soluções-mãe devem ser armazenadas com refrigeração e eliminadas após seis meses (ou antes, se existirem indícios de precipitação ou de crescimento microbiano). Preparar as seguintes soluções-mãe:

a) di-hidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 8,50g

hidrogenofosfato de dipotássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 21,75g

hidrogenofosfato de dissódio di-hidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 33,40g

cloreto de amónio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 0,50g

Dissolver em água e ajustar para 1 litro. O pH desta solução deve ser de 7,4 ( $\pm 0,2$ ). Se tal não for o caso, preparar uma solução nova;

b) cloreto de cálcio di-hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 36,40g

Dissolver em água e ajustar para 1 litro;

c) sulfato de magnésio hepta-hidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 22,50g

Dissolver em água e ajustar para 1 litro;

d) cloreto de ferro (III) hexa-hidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0,25g

Dissolver em água e ajustar para 1 litro, adicionando de seguida uma gota de ácido concentrado.

#### *Preparação do meio de sais minerais*

19. Dissolver 10 ml de solução (a) em cerca de 800 ml de água (ponto 17), adicionando de seguida 1 ml das soluções (b), (c) e (d), e ajustar o volume para 1 litro com água (ponto 17).

#### *Outros reagentes*

20. Ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) concentrado (> 85 %, em massa por volume).

#### *Solução de hidróxido de sódio 7 M*

21. Dissolver 280 g de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) em 1 litro de água (ponto 17). Determinar a concentração de carbono inorgânico dissolvido da solução e ter em conta este valor no cálculo do resultado do ensaio (ver os pontos 55 e 61), nomeadamente à luz do critério de validade que consta do ponto 66, alínea b). Se a concentração de carbono inorgânico dissolvido for demasiado elevada, preparar uma solução nova.

#### *Produto químico em estudo*

22. Preparar uma solução-mãe de um produto químico suficientemente hidrossolúvel, em água (ponto 17) ou no meio de ensaio (ponto 19), a uma concentração de preferência 100 vezes superior à concentração final a utilizar no ensaio; pode ser necessário ajustar o pH da solução-mãe. Esta solução deve ser adicionada ao meio mineral, de modo a obter uma concentração final de carbono orgânico compreendida entre 2 e 40 mg C/l (de preferência 20 mg C/l). A utilização de concentrações inferiores a estas pode comprometer a precisão dos resultados. Os produtos químicos líquidos solúveis e insolúveis podem ser diretamente introduzidos nos recipientes por meio de seringas de alta precisão. Os produtos químicos pouco solúveis e insolúveis podem exigir um tratamento especial (25). As opções nesta matéria são as seguintes:

a) adição direta de quantidades pesadas conhecidas;

b) dispersão por meio de ultrassons antes da adição;

c) dispersão com o auxílio de agentes emulsionantes, sendo necessário determinar antes da adição se os mesmos têm efeitos inibidores ou estimulantes da atividade microbiana;

d) adsorção do produto químico líquido, ou de uma solução num solvente volátil adequado, num meio ou suporte inerte (por exemplo, filtro de fibra de vidro), seguida de evaporação do solvente, se utilizado, e adição direta de quantidades conhecidas;

e) colocação no recipiente de ensaio vazio de um volume conhecido de uma solução do produto químico em estudo num solvente muito volátil, seguida de evaporação do solvente.

É necessário verificar se os agentes ou solventes utilizados nas alíneas c), d) e e) têm efeitos estimulantes ou inibidores da atividade microbiana — ver o ponto 42, alínea b).

*Produto químico de referência*

23. Preparar uma solução-mãe do produto químico (solúvel) de referência em água (ponto 17), com uma concentração, de preferência, 100 vezes superior à concentração final a utilizar no ensaio (20 mg C/l).

*Verificação da inibição*

24. Frequentemente, os produtos químicos estudados não sofrem degradação significativa nas condições utilizadas nas avaliações de biodegradabilidade "fácil". Uma das causas possíveis deste facto reside no efeito inibidor, para o inóculo, do produto químico em estudo, às concentrações em que é utilizado no ensaio. A verificação da inibição pode ser incluída no procedimento de ensaio, para facilitar a identificação (*a posteriori*) da inibição como causa possível ou fator contribuinte. A verificação da inibição também permite excluir essas interferências e demonstrar que a ausência de degradação ou a ocorrência de uma degradação ligeira é apenas atribuível a condições de ensaio pouco propícias à ação microbiana. A fim de obter informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo para microrganismos (aeróbios), preparar uma solução, no meio de ensaio, do produto químico em estudo e do produto químico de referência (ponto 19), cada um nas concentrações utilizadas no ensaio (ver os pontos 22 e 23).

*Inóculo*

25. O inóculo pode ter várias origens: lamas ativadas, efluentes de águas residuais (não clorados), águas de superfície e solos ou uma mistura destes (20). A atividade de biodegradação da fonte do inóculo deve ser verificada por recurso a um produto químico de referência. Independentemente da fonte, não devem ser utilizados microrganismos anteriormente expostos ao produto químico em estudo para ensaios de determinação da biodegradabilidade "fácil".

Atenção: As lamas ativadas, e as águas residuais ou os efluentes de águas residuais, contêm organismos patogénicos, pelo que devem ser manipulados com cuidado.

26. De acordo com a experiência adquirida, o volume ótimo de inóculo satisfaz as seguintes condições:

- é suficiente para proporcionar uma atividade de biodegradação adequada,
- degrada o produto químico de referência na percentagem estabelecida (ver o ponto 66),
- origina  $10^2$  a  $10^5$  unidades formadoras de colónias por mililitro, na mistura final,
- origina, em geral, uma concentração de 4 mg/l de sólidos em suspensão na mistura final quando se utilizam lamas ativadas; é possível utilizar concentrações até 30 mg/l, que podem, contudo, aumentar significativamente a produção de CO<sub>2</sub> nos ensaios em branco (26),
- representa menos de 10 % da concentração inicial de carbono orgânico introduzida pelo produto químico em estudo,
- é, geralmente, da ordem de 1-10 ml por litro de solução de ensaio.

*Lamas ativadas*

27. As lamas ativadas são recolhidas do frasco no tanque de arejamento de uma estação de tratamento de águas residuais, ou unidade à escala laboratorial, que trate essencialmente esgotos domésticos. Se necessário, as partículas grosseiras devem ser removidas por crivagem (p. ex., através de um crivo de malha de 1 mm<sup>2</sup>); as lamas devem ser mantidas em condições aeróbias até à sua utilização.
28. Em alternativa, após a remoção das partículas grosseiras eventualmente presentes, deixar sedimentar ou centrifugar (por exemplo, a 1 100 g durante 10 minutos). Remover o líquido sobrenadante. As lamas podem ser lavadas na solução de sais minerais. Preparar uma suspensão das lamas concentradas no meio de sais minerais, de forma a obter uma concentração de 3-5 g de sólidos em suspensão/l. Proceder de seguida ao arejamento enquanto for necessário.
29. As lamas devem ser obtidas numa estação de tratamento convencional em bom estado de funcionamento. Se forem obtidas numa estação de tratamento de débito elevado ou se nelas se admitir a presença de inibidores, devem ser lavadas. Após obter uma mistura homogénea, deixar sedimentar ou centrifugar as lamas repostas em suspensão, rejeitar o sobrenadante e preparar nova suspensão das lamas lavadas num novo volume de meio de sais minerais. Repetir este procedimento até que as lamas possam considerar-se isentas de substrato em excesso ou de inibidor.
30. Quando a nova suspensão estiver preparada, ou no caso de se utilizarem lamas não tratadas, colher uma amostra imediatamente antes da utilização, para determinar a massa seca dos sólidos em suspensão.

31. A homogeneização das lamas ativadas (3-5 g de sólidos em suspensão/l) constitui uma alternativa. Tratar as lamas num misturador de Waring durante dois minutos, a velocidade média. Deixar sedimentar a mistura de lamas durante 30 minutos ou, se necessário, por um período mais longo, e decantar o líquido, para utilização das lamas como inóculo na proporção de 10 mg/l de meio de sais minerais.
32. É possível obter uma redução ainda maior do CO<sub>2</sub> libertado no ensaio em branco através do arejamento das lamas durante a noite com ar isento de CO<sub>2</sub>. Utilizar como inóculo no presente ensaio 4 mg de sólidos das lamas ativadas por litro (13).

#### *Efluente secundário de águas residuais*

33. Em alternativa, o inóculo pode ser colhido num efluente secundário de uma estação de tratamento, ou unidade à escala laboratorial, que trate essencialmente esgotos domésticos. Manter a amostra em condições aeróbias e utilizar no dia da colheita, ou efetuar um pré-acondicionamento, se necessário. Deve utilizar-se um filtro para remover as partículas grosseiras do efluente, determinando-se também o pH.
34. Para reduzir o teor de carbono inorgânico do filtrado, borbulha-se neste ar isento de CO<sub>2</sub> — ponto 15, alínea e) — durante 1 h, mantendo o pH a 6,5 com o auxílio de ácido ortofosfórico (ponto 20). O pH inicial é reposto com o auxílio de uma solução de hidróxido de sódio (ponto 21); após sedimentação durante cerca de 1 h, toma-se uma alíquota do sobrenadante para inoculação. Este procedimento permite reduzir o teor de carbono inorgânico do inóculo. Por exemplo, quando se utiliza como inóculo o volume máximo recomendado de efluente filtrado borbulhado (100 ml) por litro, a quantidade de carbono inorgânico presente nos recipientes de ensaio em branco é da ordem de 0,4 a 1,3 mg/l (14), o que representa 2 % a 6,5 % do carbono do produto químico em estudo, relativamente a uma concentração de 20 mg C/l, e 4 % a 13 %, relativamente a uma concentração de 10 mg C/l.

#### *Águas de superfície*

35. Colher uma amostra de uma água de superfície adequada. A amostra deve ser mantida em condições aeróbias e ser utilizada no dia da colheita. Se necessário, deve ser concentrada por filtração ou centrifugação. O volume de inóculo a utilizar em cada recipiente de ensaio deve satisfazer as condições enunciadas no ponto 26.

#### *Solos*

36. Colhe-se uma amostra de um solo adequado, a uma profundidade não superior a 20 cm. Deve remover-se da amostra pedras, restos vegetais e invertebrados, após o que a amostra é peneirada através de uma malha de 2 mm (se a amostra estiver demasiado húmida para ser peneirada de imediato, secá-la parcialmente ao ar para facilitar a operação). A amostra deve ser mantida em condições aeróbias e ser utilizada no dia da colheita (se for transportada num saco de polietileno negro não hermético, pode ser armazenada nesse saco, a uma temperatura de 2 a 4 °C, pelo período máximo de um mês).

#### *Pré-acondicionamento do inóculo*

37. Os inóculos podem ser pré-acondicionados para as condições experimentais, mas não podem ser pré-adaptados ao produto químico em estudo. O pré-acondicionamento pode reduzir a libertação de CO<sub>2</sub> nos recipientes de ensaio em branco. A operação consiste em arejar as lamas ativadas, durante cinco a sete dias, com ar húmido isento de CO<sub>2</sub>, à temperatura de ensaio, após diluição para 30 mg/l no meio de ensaio.

#### **PROCEDIMENTO**

##### *Número de frascos*

38. O número de frascos — ponto 15, alínea a) — necessários depende da frequência das análises e da duração do ensaio.
39. Recomenda-se a análise de frascos em triplicado após um número suficiente de períodos, de modo a permitir a identificação do período de 10 dias. Devem também analisar-se, pelo menos, cinco frascos — ponto 15, alínea a) — das séries a), b) e c) (ver o ponto 42), no final do ensaio, para permitir o cálculo de intervalos de confiança de 95 % para a percentagem média de biodegradação.

##### *Meio inoculado*

40. O inóculo é utilizado numa concentração de 4 mg de sólidos secos de lamas ativadas por litro. Preparar, imediatamente antes da utilização, uma quantidade suficiente de meio inoculado, por exemplo, adicionando 2 ml de lamas ativadas sujeitas a um tratamento adequado (pontos 27 a 32), à concentração de 2 000 mg/l, a 1 litro de meio de sais minerais (ponto 19). Se forem utilizados efluentes secundários de águas residuais, adicionar 100 ml de efluente (ponto 33) a 900 ml de meio de sais minerais (ponto 19) e diluir para 1 litro com o meio.

*Preparação dos frascos*

41. Coloca-se alíquotas de meio inoculado em séries de frascos replicados, de forma a obter uma proporção espaço livre/líquido de 1:2 (colocar, por exemplo, 107 ml em frascos de 160 ml de capacidade). Pode utilizar-se outras proporções, atendendo, contudo, às recomendações que constam do ponto 11. Qualquer que seja o tipo de inóculo utilizado, deve assegurar-se que o meio inoculado está devidamente homogeneizado, tendo em vista a sua distribuição uniforme nos frascos de ensaio.
42. Prepara-se as seguintes séries de frascos – ponto 15, alínea a):
  - a) recipientes de ensaio (assinalados por  $F_T$ ), que contêm o produto químico em estudo;
  - b) recipientes de ensaio em branco (assinalados por  $F_B$ ) que contêm apenas o meio de ensaio e o inóculo; devem adicionar-se também quaisquer produtos químicos, solventes, agentes ou filtros de fibra de vidro utilizados para a introdução do produto químico em estudo nos recipientes de ensaio;
  - c) recipientes para controlo do processo (assinalados por  $F_C$ ), que contêm o produto químico de referência;
  - d) se necessário, recipientes destinados à verificação do possível efeito inibidor do produto químico em estudo (assinalados por  $F_I$ ), que contêm este e o produto químico de referência nas mesmas concentrações que, respetivamente, os frascos  $F_T$  e  $F_C$  (ponto 24);
  - e) recipientes (assinalados por  $F_D$ ) destinados à verificação da possível degradação abiótica, preparados como descrito na alínea a), mas contendo, além disso, 50 mg/l de  $HgCl_2$  ou esterilizados por outros meios (por exemplo, tratamento em autoclave).
43. Os produtos químicos em estudo e de referência hidrossolúveis são adicionados na forma de soluções-mãe aquosas (pontos 22, 23 e 24), de modo a obter uma concentração de 10 a 20 mg C/l.
44. Os produtos químicos em estudo e de referência insolúveis em água são introduzidos nos frascos de diversas formas — ver o ponto 22, alíneas a)-e) —, consoante a sua natureza, antes ou depois da adição do meio inoculado, em função do método de tratamento do produto químico em estudo. Se for utilizado um dos métodos indicados no ponto 22, alíneas a) a e), os frascos  $F_B$  — ponto 42, alínea b) — devem ser tratados de forma idêntica, mas sem o produto químico em estudo e o produto químico de referência.
45. Os produtos químicos em estudo voláteis devem ser injetados nos frascos selados (ponto 47) com o auxílio de uma microseringa. A dose é calculada com base no volume injetado e na densidade do produto.
46. Quando necessário, deve acrescentar-se água aos recipientes, de forma que o volume de líquido seja idêntico em todos eles. Deve garantir-se que a razão entre o espaço livre e o volume de líquido (geralmente 1:2), bem como a concentração do produto químico em estudo, sejam tais que a quantidade de oxigénio presente no espaço livre seja suficiente para permitir a biodegradação completa.
47. Seguidamente, todas as garrafas são seladas, por exemplo, com rolhas de borracha butílica e cápsulas de alumínio. Os produtos químicos em estudo voláteis devem ser introduzidos nesta fase (ponto 45). Caso se pretenda monitorizar o decréscimo da concentração de COD da solução de ensaio e efetuar análises da concentração inicial de carbono inorgânico — controlos "estéreis"; ponto 42, alínea e) — ou outras determinações, colher uma amostra adequada do recipiente de ensaio. O recipiente de ensaio e o seu conteúdo são, em seguida, eliminados.
48. Os frascos selados são colocados num agitador rotativo — ponto 15, alínea d) —, com uma agitação suficiente para manter o conteúdo homogeneizado e em suspensão (por exemplo, 150 a 200 rpm), e incubados, no escuro, à temperatura de  $20\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ .

*Amostragem*

49. O padrão de amostragem depende do período de latência e da taxa cinética de biodegradação do produto químico em estudo. Retiram-se frascos para análise no dia da colheita de amostras, que deve ocorrer, pelo menos, uma vez por semana, ou, caso se pretenda obter uma curva de degradação completa, com uma frequência superior (por exemplo, duas vezes por semana). Retira-se do agitador o número necessário de frascos replicados, designadamente  $F_T$ ,  $F_B$  e  $F_C$  e, se for caso disso,  $F_I$  e  $F_S$  (ver o ponto 42). O ensaio prolonga-se, geralmente, por 28 dias. Se a curva de biodegradação exibir um patamar antes do 28.º dia, o ensaio pode ser concluído. Colher, para análise, amostras dos cinco frascos reservados para o 28.º dia e utilizar os resultados para calcular os limites de confiança ou o coeficiente de variação da percentagem de biodegradação. Os frascos respeitantes ao controlo da inibição e da degradação abiótica não necessitam de amostragem tão frequente quanto os restantes frascos; basta colher amostras no 1.º e no 28.º dia.

*Análise do carbono inorgânico*

50. A produção de CO<sub>2</sub> nos frascos é determinada através da medição do aumento da concentração de carbono inorgânico (CI) durante a incubação. Recomendam-se dois métodos para a medição da quantidade de carbono inorgânico produzida no ensaio, que se descrevem a seguir. Dado que os métodos podem conduzir a resultados ligeiramente diferentes, deve ser utilizado apenas um deles por série de ensaios.
51. O método a) é recomendado se for provável que o meio contenha resíduos, nomeadamente, de filtros de fibra de vidro e/ou de produtos químicos em estudo insolúveis. Caso não se disponha de um analisador de carbono, esta análise poderá ser realizada por recurso a um cromatógrafo em fase gasosa. É importante que os frascos se encontrem à temperatura de ensaio, ou a uma temperatura próxima desta, quando se procede à análise do gás presente no espaço livre. O método b) pode ser de utilização mais fácil para os laboratórios que utilizam analisadores de carbono para determinar o carbono inorgânico. É importante que a solução de hidróxido de sódio (ponto 21) utilizada para converter o CO<sub>2</sub> em carbonato seja preparada na altura ou que o seu teor de carbono inorgânico seja conhecido, a fim de que este parâmetro possa ser tido em conta no cálculo dos resultados dos ensaios — ver o ponto 66, alínea b).

*Método a): acidificação a pH < 3*

52. Antes de efetuar cada série de análises, o analisador de carbono inorgânico é calibrado utilizando uma substância com um teor-padrão de carbono inorgânico — por exemplo, mistura a 1 % (m/m) de CO<sub>2</sub> em N<sub>2</sub>. Injeta-se ácido ortofosfórico concentrado (ponto 20) através do septo de cada frasco de amostra, de forma a reduzir o pH do meio para menos de 3 (adicionar, por exemplo, 1 ml a 107 ml de meio de ensaio). Os frascos são então recolocados no agitador. Após agitação durante uma hora à temperatura de ensaio, os frascos são removidos do agitador, colhendo-se alíquotas (por exemplo, 1 ml) de gás no espaço livre de cada frasco, que se injetam no analisador de carbono inorgânico. As concentrações de carbono inorgânico são registadas em mg C/l.
53. O princípio deste método reside em que, após acidificação a pH < 3 e equilíbrio a 20 °C, a constante de partição do CO<sub>2</sub> entre as fases gasosa e líquida nos frascos de ensaio, determinada em termos de concentração, ser de 1,0 (13). Este facto deve ser comprovado, para o sistema de ensaio, pelo menos uma vez, do seguinte modo:

Preparar frascos com teores de carbono inorgânico de 5 e 10 mg/l, por recurso a uma solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) anidro em água isenta de CO<sub>2</sub>, preparada por acidificação de água a pH 6,5 com ácido ortofosfórico concentrado (ponto 20), na qual se fez borbulhar, de um dia para o outro, ar isento de CO<sub>2</sub>, e se neutralizou depois o pH com álcalis. Assegurar que a proporção entre o espaço livre e o volume de líquido é a mesma que nos ensaios (por exemplo, 1:2). Acidificar e deixar estabilizar do modo descrito no ponto 52, determinando de seguida as concentrações de carbono inorgânico no espaço livre e na fase líquida. Verificar se as concentrações são iguais, dentro dos limites do erro experimental. Se não forem, o operador deve reexaminar os procedimentos. Não é necessário verificar em cada ensaio a partição do carbono inorgânico entre as fases gasosa e líquida. A verificação pode, em geral, ser efetuada aquando da calibração.

54. Caso se pretenda determinar a remoção do COD (apenas no caso de produtos químicos solúveis em água), devem colher-se amostras da fase líquida de frascos distintos (não acidificados), que são filtradas por uma membrana e injetadas no analisador de COD. Estes frascos podem ser utilizados para outras análises, consoante necessário, com o objetivo de determinar a biodegradação primária.

*Método b): conversão de CO<sub>2</sub> a carbonato*

55. Antes de cada série de análises, o analisador de carbono inorgânico é calibrado com um padrão adequado — por exemplo, uma solução de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) em água isenta de CO<sub>2</sub> (ver o ponto 53), na gama de concentrações de carbono inorgânico de 0 a 20 mg/l. Injeta-se através do septo de cada frasco no qual se colhe uma amostra uma solução de hidróxido de sódio 7 M (ponto 21) — por exemplo, 1 ml em 107 ml de meio —, sendo esses frascos agitados durante 1 h à temperatura de ensaio. Utilizar a mesma solução de NaOH em todos os frascos retirados num determinado dia, mas não obrigatoriamente em todas as colheitas destas amostras ao longo do ensaio. Se forem necessários valores absolutos de concentrações de carbono inorgânico das amostras em branco quando de todas as colheitas de amostras, é necessário determinar o teor de carbono inorgânico da solução de NaOH em cada utilização. Remover os frascos em causa do agitador e colocá-los em repouso. Retirar com uma seringa volumes adequados (por exemplo, 50 a 1 000 µl) da fase líquida de cada frasco. Injetar as amostras no analisador de carbono inorgânico, registando as concentrações deste obtidas. Deve assegurar-se que o aparelho é adequado às amostras alcalinas produzidas no presente método.
56. O princípio do método reside em que, após a adição de solução alcalina e a agitação, o teor de carbono inorgânico no espaço livre é insignificante. Este facto deve ser comprovado para cada sistema de ensaio pelo menos uma vez, por recurso a padrões de carbono inorgânico, mediante a adição de uma solução alcalina, estabilização e a determinação da concentração de carbono inorgânico no espaço livre e nas fases líquidas (ver o ponto 53). A concentração no espaço livre deve ser praticamente nula. Não é necessário verificar a absorção quase completa do CO<sub>2</sub> em cada ensaio.
57. Caso se pretenda determinar a remoção do COD (apenas no caso de produtos químicos solúveis em água), devem colher-se amostras da fase líquida de frascos distintos sem solução alcalina adicionada, que são filtradas por uma membrana e injetadas no analisador de COD. Estes frascos podem ser utilizados para outras análises, consoante necessário, com o objetivo de determinar a biodegradabilidade primária.



## DADOS E RELATÓRIOS

**Cálculo dos resultados**

58. Pressupondo que a mineralização do produto químico em estudo em CO<sub>2</sub> é de 100 %, o teor de carbono inorgânico teórico (CITe) superior ao produzido nos frascos de ensaio em branco é igual ao COT adicionado a cada frasco no início dos ensaios, isto é:

$$\text{CITe} = \text{COT.}$$

A massa total (mg) de carbono inorgânico (CIT) em cada frasco é:

$$\text{CIT} = (\text{mg C na fase líquida} + \text{mg C no espaço livre}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{Equação 1}$$

em que:

$V_L$  = volume de líquido no frasco (litros);

$C_L$  = concentração de carbono inorgânico no líquido (mg/l, expressa em carbono);

$V_H$  = volume do espaço livre (litros);

$C_H$  = concentração de carbono inorgânico no espaço livre (mg/l, expressa em carbono).

O cálculo do CIT em ambos os métodos de análise utilizados para a determinação do carbono inorgânico no presente ensaio é descrito nos pontos 60 e 61. A percentagem de biodegradação (% D), em ambos os casos, é dada por:

$$\%D = \frac{(\text{TIC}_t - \text{TIC}_b)}{\text{TOC}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

em que:

$\text{CIT}_t$  = mg de CIT no frasco de ensaio, no instante  $t$ ;

$\text{CIT}_b$  = mg de CIT (em média) nos frascos de ensaio em branco, no instante  $t$ ;

COT = mg de COT almente no recipiente de ensaio.

A percentagem de biodegradação (% D) é calculada para os frascos de ensaio ( $F_T$ ), de referência ( $F_C$ ) e, caso tenham sido incluídos, de controlo da inibição ( $F_I$ ), com base nas quantidades respetivas de CIT produzidas até ao instante da colheita de cada amostra.

59. Caso se observe um aumento significativo do teor de CIT nos frascos de controlo estéreis ( $F_S$ ) no período de ensaio, pode concluir-se ter ocorrido degradação abiótica do produto químico em estudo, devendo este facto ser tido em conta no cálculo do parâmetro D na equação 2.

**Acidificação para pH < 3**

60. Uma vez que a acidificação para pH < 3 e o posterior equilíbrio resultam na uniformização da concentração de carbono inorgânico total nas fases gasosa e líquida, apenas é necessário determinar a concentração de carbono inorgânico na fase gasosa. Aplica-se a equação 1  $\text{CIT} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$ , em que  $V_B$  é o volume do frasco de soro.

### Conversão do CO<sub>2</sub> em carbonato

61. No presente método, os cálculos são realizados como na equação 1, sem ter em conta a quantidade insignificante de carbono inorgânico na fase gasosa, ou seja,  $V_H \times C_H = 0$  e  $CIT = V_L \times C_L$ .

### Expressão dos resultados

62. A curva de biodegradação é obtida através da representação gráfica da percentagem de biodegradação (D) em função do tempo de incubação, indicando-se, se possível, a fase de latência, a fase de degradação, o período de 10 dias e a fase de patamar, que é a fase na qual já se atingiu a degradação máxima e a curva de biodegradação estabilizou. Se forem obtidos resultados comparáveis (diferença inferior a 20 %) para os recipientes de ensaio em paralelo,  $F_T$ , representa-se graficamente uma curva média (ver o apêndice 2, figura 1); se tal não for o caso, representam-se as curvas relativas a cada recipiente. Determina-se o valor médio da percentagem de biodegradação na fase de patamar ou identifica-se o valor mais elevado da mesma (por exemplo, quando a curva começa a infletir, na fase de patamar), mas, neste último caso, é importante verificar se o valor em causa não é anómalo. No relatório dos ensaios, este nível máximo de biodegradação deve ser expresso como "grau de biodegradação do produto químico em estudo". Se o número de recipientes de ensaio se tiver revelado insuficiente para definir uma fase de patamar, utilizam-se os dados determinados no último dia do ensaio para calcular um valor médio. Este valor (média de cinco replicados), serve de indicador da precisão de determinação da percentagem de biodegradação. Indicar também o valor obtido no final do período de 10 dias.
63. Representar, do mesmo modo, a curva correspondente ao produto químico de referência ( $F_C$ ), bem como, se for caso disso, a curva relativa ao controlo da eliminação abiótica ( $F_S$ ) e a curva relativa ao controlo da inibição ( $F_I$ ).
64. Registrar os teores de carbono inorgânico total presentes nos ensaios em branco ( $F_B$ ), bem como, se for caso disso, os teores de CIT presentes nos frascos  $F_S$  (controlo da eliminação abiótica).
65. Calcular a degradação (D) para os recipientes  $F_I$  a partir do rendimento teórico de carbono inorgânico previsto apenas com base no componente de referência da mistura. Se, no dia 28,  $[(D_{FC}^{(1)} - D_{FI}^{(2)})/D_{FC}] \times 100 > 25 \%$ , pode presumir-se que o produto químico em estudo inibe a atividade do inóculo, facto que permite justificar os valores reduzidos de  $D_{FI}$  obtidos nas condições de ensaio. Neste caso, pode repetir-se o ensaio com uma concentração mais baixa, reduzindo, de preferência, o CID no inóculo e o CIT formado nos ensaios em branco, dado que, se assim não for, a redução da concentração reduzirá a precisão do método. Em alternativa, pode utilizar-se outro inóculo. Se, no frasco  $F_S$  (controlo da eliminação abiótica), se observar um aumento significativo (> 10 %) da quantidade de CIT, é possível que tenham ocorrido processos de degradação abiótica.

### Validade dos resultados

66. Um ensaio é considerado válido se:
- a percentagem média de degradação nos recipientes que contêm o produto químico de referência ( $F_C$ ) for superior a 60 % até ao 14.º dia de incubação; e
  - a quantidade média de CIT presente nos ensaios em branco ( $F_B$ ) no final do ensaio for superior a 3 mg C/l.

Se estes valores-limite não forem satisfeitos, repetir o ensaio com um inóculo proveniente de outra fonte e/ou rever os procedimentos utilizados. Por exemplo, caso se registre uma elevada produção de carbono inorgânico no ensaio em branco, deve seguir-se o procedimento indicado nos pontos 27 a 32.

67. Se o produto químico em estudo não gerar 60 % do teor de carbono inorgânico teórico e tiver sido demonstrado que não tem efeitos inibidores (ponto 65), pode repetir-se o ensaio com uma concentração mais elevada de inóculo (até 30 mg de lamas ativadas por litro e 100 ml de efluente por litro) ou com inóculos provenientes de outras fontes, nomeadamente nos casos em que a degradação se tenha situado na gama de 20 a 60 %.

### Interpretação dos resultados

68. A obtenção de uma biodegradação superior a 60 % do carbono inorgânico teórico no período de 10 dias do presente ensaio demonstra que o produto químico em estudo é facilmente biodegradável em condições aeróbias.
69. Se o referido valor de 60 % não for atingido, determinar o pH no meio presente nos frascos que não tenham sido acidificados nem alcalinizados; um valor inferior a 6,5 pode indicar a ocorrência de nitrificação. Nesse caso, repetir o ensaio com uma solução-tampão de concentração mais elevada.

(1) Percentagem de degradação nos recipientes  $F_C$ , que contêm a substância de referência.

(2) Percentagem de degradação nos recipientes  $F_I$ .

**Relatório dos ensaios**

70. Elaborar um quadro com a percentagem de degradação para cada frasco de ensaio ( $F_T$ ), de referência ( $F_C$ ) e, se for caso disso, de controlo da inibição ( $F_I$ ), para cada dia de colheita de amostras. Se forem obtidos resultados comparáveis para os frascos replicados, traçar a curva da percentagem média de degradação (% D) em função do tempo. Registar o CIT nos frascos correspondentes aos ensaios em branco ( $F_B$ ) e aos controlos estéreis ( $F_S$ ), bem como o COD e/ou outros parâmetros, além da percentagem de remoção.
71. Determinar o valor médio da percentagem de degradação na fase de patamar, ou utilizar o valor mais elevado, se a curva de biodegradação começar a infletir na fase de patamar, e apresentar um deles como "grau de biodegradação do produto químico em estudo". Neste último caso, importa garantir que o valor mais elevado não é um resultado anómalo.
72. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

*Produto químico em estudo:*

- denominação comum, denominação química, número CAS, fórmula estrutural e propriedades físico-químicas pertinentes,
- grau de pureza do produto químico (presença de impurezas).

*Condições experimentais:*

- referência ao presente método,
- descrição do sistema de ensaio utilizado (por exemplo, volume dos recipientes, proporção espaço livre/volume de líquido, método de agitação, etc.),
- introdução do produto químico em estudo e do produto químico de referência no sistema de ensaio: concentração de ensaio utilizada, e quantidade de carbono introduzida, em cada frasco de ensaio, bem como os solventes eventualmente utilizados,
- pormenores relativos ao inóculo utilizado, bem como a qualquer pré-tratamento e pré-acondicionamento,
- temperatura de incubação,
- validação do princípio de análise do carbono inorgânico,
- principais características do analisador de carbono inorgânico (e de quaisquer outros métodos analíticos utilizados),
- número de replicados.

*Resultados:*

- dados não tratados e valores de biodegradabilidade calculados, na forma de quadros,
- gráfico da percentagem de degradação em função do tempo, para o produto químico em estudo e o produto químico de referência, fase de latência, fase de degradação, período de 10 dias e declive,
- percentagem de remoção na fase de patamar, no final do ensaio e após o período de 10 dias,
- motivos de uma eventual rejeição de resultados dos ensaios,
- quaisquer outros factos relevantes ligados ao procedimento seguido,
- discussão dos resultados.

## REFERÊNCIAS:

- (1) Capítulo C.4 deste anexo: "Determinação da biodegradabilidade 'fácil' — Ensaio da libertação de CO<sub>2</sub>" (método C.4-C).
- (2) Sturm R.N. (1973): Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. *J. A. Oil Chem. Soc.* 50: 159-167.
- (3) Larson R.J. (1979): Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. *Appl. Env. Microbiol.* 38: 1153-1161.
- (4) Larson R.J., Hansmann M.A., Bookland E.A. (1996): Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants. *Chemosphere* 33: 1195-1210.
- (5) ISO 9439 (1990; revista em 1999). Water Quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium — Carbon dioxide evolution Test (Sturm).
- (6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office Prevention Pesticides and Toxic Substances. Washington, DC.
- (7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office Prevention Pesticides and Toxic Substances. Washington, DC.
- (8) Gledhill W.E. (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. *Appl. Microbiol.* 30: 922-929.
- (9) Weytjens D., Van Ginneken I., Painter H.A. (1994): The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. *Chemosphere* 28: 801-812.
- (10) Ennis D.M., Kramer A. (1975): A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. *J. Food Sci.* 40: 181-185.
- (11) Ennis D.M., Kramer A., Jameson C.W., Mazzoccki P.H., Bailey P. (1978). *Appl. Env. Microbiol.* 35: 51-53.
- (12) Boatman R., Cunningham S.L., Ziegler D.A. (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals. *Env. Toxicol. Chem.* 5: 233-243.
- (13) Struijs J., Stoltenkamp J. (1990): Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. *Ecotox. Env. Safety* 19: 204-211.
- (14) Birch R.R., Fletcher R.J. (1991): The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. *Chemosphere* 23: 507-524.
- (15) Birch R.R., Biver C., Campagna R., Gledhill W.E., Pagga U., Steber J., Reust H., Bontinck W.J. (1989): Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19: 1527-1550.
- (16) ISO 14593 (1999) Water Quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO<sub>2</sub> headspace test).
- (17) Battersby N.S. (1997): The ISO headspace CO<sub>2</sub> biodegradation test. *Chemosphere* 34: 1813-1822.
- (18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance. Washington, DC.
- (19) Battersby N.S., Ciccognani D., Evans M.R., King D., Painter H.A., Peterson D.R., Starkey M. (1999): An "inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. *Chemosphere* 38: 3219-3235.

- 
- (20) Capítulo C.4 deste anexo: "Determinação da biodegradabilidade 'fácil'".
- (21) OCDE (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (Kitano, M., Takatsuki, M.; CITI). Paris.
- (22) Capítulo C.11 deste anexo: "Biodegradação — Lamas Ativadas: Ensaios de Inibição da Respiração".
- (23) Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M.J., Dekkers A.L.M. (1995): A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. *Biodegradation* 6: 319-327.
- (24) UE (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO<sub>2</sub> method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697. Water Research Centre, Maio de 1999. Medmenham, SL7 2HD, Reino Unido.
- (25) ISO 10634 (1996). Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
-

## Apêndice 1

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

**CI:** carbono inorgânico.

**CO<sub>2</sub>Te:** o dióxido de carbono teórico (mg) é a quantidade calculada do dióxido de carbono que seria produzido a partir do teor de carbono medido ou conhecido do produto químico em estudo, quando totalmente mineralizado; também pode ser expresso em mg de dióxido de carbono libertado por mg de produto químico em estudo.

**COD:** o carbono orgânico dissolvido é o carbono orgânico presente na solução ou que passa através de um filtro de 0,45 micra ou que permanece no sobrenadante após centrifugação a cerca de 4 000 g (aproximadamente 40 000 ms<sup>-2</sup>) durante 15 minutos.

**CID:** carbono inorgânico dissolvido.

**CITe:** carbono inorgânico teórico.

**CIT:** carbono inorgânico total.

**Facilmente biodegradável:** classificação arbitrária atribuída aos produtos químicos que satisfazem os critérios de determinados ensaios específicos de verificação da biodegradabilidade total; dado o grau de exigência destes ensaios, presume-se que esses produtos químicos são fácil e completamente biodegradados num ambiente aquático, em condições aeróbias.

**Período de dez dias:** período de dez dias imediatamente após ter sido alcançado o nível de biodegradação de 10 %.

**Biodegradabilidade inerente:** classificação atribuída aos produtos químicos para os quais existem provas inequívocas de biodegradação (primária ou total) num ensaio de biodegradabilidade.

**Biodegradação aeróbia total:** nível de degradação alcançado quando o produto químico em estudo é totalmente consumido pelos microrganismos, produzindo dióxido de carbono, água, sais minerais e novos componentes celulares microbianos (biomassa).

**Mineralização:** degradação completa de um produto químico orgânico em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, em condições aeróbias, ou em CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, em condições anaeróbias.

**Fase de latência:** período que decorre do início do ensaio até à aclimação e/ou adaptação dos microrganismos responsáveis pela degradação e ao surgimento de um grau detetável de biodegradação do produto químico ou matéria orgânica em estudo (p. ex.: 10 % da biodegradação teórica máxima, ou menos, consoante a precisão da técnica de medição).

**Fase de degradação:** período que decorre do final da fase de latência até ao momento em que se atinge 90 % da degradação máxima.

**Fase de patamar:** fase na qual já se atingiu a degradação máxima e a curva de biodegradação estabiliza.

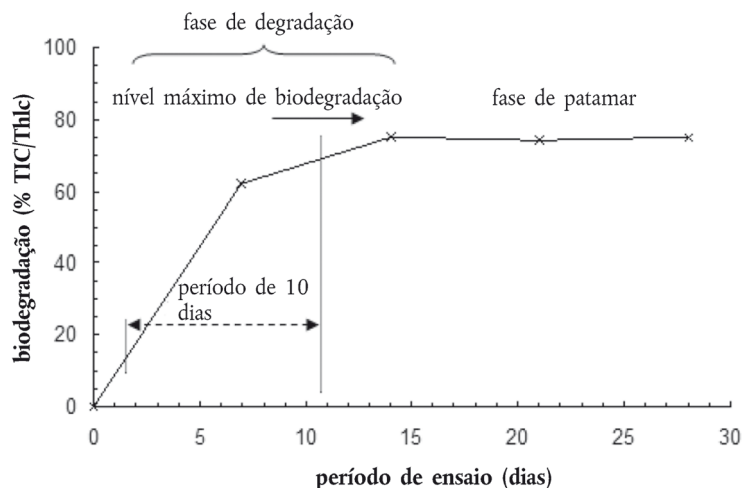
**Produto químico em estudo:** qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

---

## Apêndice 2

## Exemplo de curva de biodegradação

Figura 1

Biodegradação do 1-octanol no ensaio do CO<sub>2</sub> no espaço livre

## Glossário

biodegradação

fase de degradação

nível máximo de biodegradação

fase de patamar

período de 10 dias

período de ensaio (dias)

## C.30. BIOACUMULAÇÃO EM OLIGOQUETAS TERRESTRES

## INTRODUÇÃO

- Este método de ensaio é equivalente ao da *Test Guideline 317* (TG 317) da OCDE (2010). Entre os métodos de ensaio relativos ao destino ambiental, foram publicados, respetivamente em 1996 e em 2008, "Bioconcentração: ensaio dinâmico no peixe" — capítulo C.13 deste anexo (49) e "Bioacumulação em oligoquetas bentónicas sedimentares" (53). A extrapolação dos dados de bioacumulação em meio aquático para organismos terrestres como as minhocas é difícil, senão impossível. São atualmente utilizados modelos de cálculo baseados na lipofilia do produto químico — p. ex., 14 e 37 — para avaliar a bioacumulação de produtos químicos no solo, tal como consta, por exemplo, do documento de orientação técnica da UE (19). A necessidade de um método de ensaio aplicável ao compartimento específico foi já abordada — p. ex., 55. Um tal método é particularmente importante para avaliar o envenenamento secundário nas cadeias alimentares terrestres (4). Há diversos métodos de ensaio nacionais que têm por objeto a bioacumulação noutros organismos que não os peixes — p. ex., 2 e 72. A *American Society for Testing and Materials* preparou um método de medição da bioacumulação causada por solos contaminados em minhocas (*Eisenia fétida*, Savigny) e oligoquetas da família *Enchytraeidae* (3). Um método internacionalmente aceite para a determinação da bioacumulação num solo enriquecido com determinado produto químico irá melhorar a avaliação dos riscos dos produtos químicos nos ecossistemas terrestres — p. ex., 25 e 29.
- Os invertebrados geófagos estão expostos aos produtos químicos presentes no solo. Entre eles, os oligoquetas terrestres desempenham um papel importante na estrutura e na função dos solos (15)(20). Vivem no solo e, em parte, à superfície (sobretudo na manta morta) e representam frequentemente as espécies mais abundantes em termos de biomassa (54). Por causarem bioturbação do solo e por servirem de presa, estes animais podem ter grande influência na biodisponibilização de produtos químicos a outros organismos predadores, quer invertebrados — p. ex., ácaros e coleópteros, cf. 64 —, quer vertebrados — p. ex., raposas e gaivotas, cf. 18 e 62. No apêndice 5 são referidas algumas espécies de oligoquetas terrestres atualmente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos.

3. O guia da ASTM para ensaios laboratoriais de toxicidade do solo e de bioacumulação na minhoca *Eisenia fetida* e no oligoqueta *Enchytraeus albidus* (3) fornece muitas informações essenciais e úteis para a execução deste método de ensaio da bioacumulação no solo. Outros documentos referidos neste método de ensaio são o capítulo C.13 — "Bioconcentração: ensaio dinâmico no peixe" (49) — deste anexo e o *Test Guideline 315* da OCDE — *Bioaccumulation on Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes* (bioacumulação em oligoquetas bentónicas sedimentares), (53). Os resultados práticos referidos em estudos e publicações sobre bioacumulação no solo — p. ex., 1, 5, 11, 12, 28, 40, 43, 45, 57, 59, 76, 78 e 79 — são também uma importante fonte de informação para este método de ensaio.
4. O método é maioritariamente aplicável a produtos químicos orgânicos neutros e estáveis, que têm tendência para ser adsorvidos no solo. Permite estudar a bioacumulação de compostos organometálicos estáveis que se associam ao solo e é também aplicável a metais e outros oligoelementos.

#### CONDIÇÃO PRÉVIA

5. Para medir a bioacumulação de um produto químico em oligoquetas terrestres, foram realizados ensaios com metais pesados — p. ex., 63 — e com produtos químicos orgânicos persistentes que acusam valores de  $\log K_{ow}$  entre 3,0 e 6,0 — p. ex., 40. Esses ensaios também se aplicam a:
  - produtos químicos com  $\log K_{ow}$  superior a 6,0 (superidrofóbicos),
  - produtos químicos pertencentes a classes de produtos químicos orgânicos com potencial reconhecido de bioacumulação em organismos vivos (por exemplo, produtos químicos tensioativos ou altamente adsorvíveis),
  - produtos químicos com potencial de bioacumulação dedutível das suas características estruturais (por exemplo, análogos de produtos químicos com potencial de bioacumulação conhecido) e
  - metais.
6. Antes de se iniciar o estudo, devem ser obtidos elementos identificativos do produto químico em causa, como: nome comum, denominação química (preferivelmente a denominação IUPAC), fórmula estrutural, número de registo CAS, grau de pureza, precauções de segurança, condições de conservação adequadas e métodos de análise. Devem também ser conhecidos os seguintes dados:
  - a) solubilidade em água;
  - b) coeficiente de partição octanol/água,  $K_{ow}$ ;
  - c) coeficiente de partição solo-água, expresso como  $K_{oc}$ ;
  - d) pressão de vapor;
  - e) degradabilidade (por exemplo, no solo e na água);
  - f) metabolitos conhecidos.
7. Podem ser utilizados no estudo produtos químicos com ou sem marcação radioativa. No entanto, para facilitar a análise, recomenda-se a utilização dos primeiros. A decisão deve ser tomada com base nos limites de deteção ou na obrigatoriedade de medir o produto químico parental e os seus metabolitos. Se for utilizado um produto químico com marcação radioativa e forem medidos os resíduos radioativos totais, importa que os resíduos com marcador radioativo presentes quer no solo quer nos organismos em estudo sejam caracterizados em termos de percentagem de produto químico parental e de percentagens de produtos químicos marcados não parentais — por exemplo, em amostras recolhidas em estado estacionário ou no final da fase de absorção — para permitir calcular o fator de bioacumulação (BAF) do produto químico parental e dos metabolitos pertinentes deste no solo (cf. ponto 50). O método aqui descrito poderá ter de ser modificado — por exemplo, a fim de se dispor de biomassa suficiente — para medir produtos químicos orgânicos sem marcação radioativa ou metais. Na medição dos resíduos radioativos totais (por contagem de cintilação em meio líquido após extração, combustão ou solubilização dos tecidos), o fator de bioacumulação baseia-se no produto químico parental e nos metabolitos deste. O cálculo do BAF deve preferencialmente ter por base a concentração do produto químico parental nos organismos e os resíduos radioativos totais. Seguidamente, por razões de comparabilidade entre os resultados dos diversos ensaios de bioacumulação, calcula-se a partir do BAF o fator de acumulação biota-solo (BSAF), normalizado em relação ao teor de lípidos dos vermes e ao teor de carbono orgânico do solo.



8. A toxicidade do produto químico em estudo para as espécies utilizadas no ensaio deve ser conhecida: por exemplo, a concentração com efeitos ( $CE_{\chi}$ ) ou a concentração letal ( $CL_{\chi}$ ) relativas ao tempo de duração da fase de absorção — p. ex., 19. A concentração do produto químico em estudo deve ser, preferencialmente, cerca de 1 % da  $CL_{50}$  aguda assintótica do mesmo e pelo menos dez vezes superior ao limite de deteção do produto químico no solo pelo método de análise utilizado. Se possível, deve ser dada preferência a valores de toxicidade derivados de estudos de longa duração a efeitos subletais (51)(52). Se não estiverem disponíveis tais dados, um teste de toxicidade aguda dará informações úteis — p. ex., 23.
9. Deve dispor-se de um método de análise adequado, com exatidão, precisão e sensibilidade conhecidas, para determinar quantitativamente o produto químico nas soluções de ensaio, no solo e na matéria biológica, juntamente com os pormenores da preparação e da armazenagem das amostras e as correspondentes fichas de dados de segurança. Devem também ser conhecidos os limites analíticos de deteção do produto químico no solo e nos tecidos dos vermes. Se for utilizado no ensaio um produto químico marcado com  $^{14}C$ , devem ser conhecidas a radioatividade específica (em  $Bq \cdot mol^{-1}$ ) e a percentagem de radioatividade associada a impurezas. A radioatividade específica do produto químico em estudo deve ser suficientemente elevada para facilitar as análises, e as concentrações de ensaio não devem induzir efeitos tóxicos.
10. O ensaio pode ser executado com solo artificial ou natural. Antes de se iniciar o ensaio, importa conhecer as características do solo natural utilizado, como, por exemplo, a origem ou os componentes do solo, o pH, o teor de carbono orgânico, a distribuição granulométrica (percentagem de areia, de limo e de argila) e a capacidade de retenção de água — (3)(48).

#### PRINCÍPIO DO ENSAIO

11. Os parâmetros que caracterizam a bioacumulação de um produto químico incluem o fator de bioacumulação (BAF), a constante de velocidade de absorção ( $k_a$ ) e a constante de velocidade de eliminação ( $k_e$ ). Estes parâmetros são definidos no apêndice 1.
12. O ensaio compreende duas fases: a fase de absorção (exposição) e a fase de eliminação (pós-exposição). Durante a fase de absorção, são expostos ao solo, previamente enriquecido com o produto químico em estudo, grupos replicados de vermes. Paralelamente aos vermes cobaias, mantêm-se em condições idênticas, mas sem o produto químico em estudo, grupos de vermes de controlo. Mede-se a massa seca e o teor de lípidos dos organismos sujeitos ao ensaio. Para o efeito, podem utilizar-se vermes do grupo de controlo. Os valores de fundo analíticos (ensaio em branco) podem ser obtidos analisando amostras dos vermes de controlo e do solo. Para a fase de eliminação, os vermes são transferidos para um solo isento do produto químico em estudo. É sempre necessária uma fase de eliminação, a menos que a absorção do produto químico durante a fase de exposição tenha sido insignificante. A fase de eliminação fornece informações sobre a velocidade à qual o produto químico é excretado pelos organismos sujeitos ao ensaio — p. ex., 27. Se, durante a fase de absorção, não tiver sido atingido um estado estacionário, a determinação dos parâmetros cinéticos — fator de bioacumulação cinético  $BAF_k$ , constante de velocidade de absorção e constante de velocidade de eliminação — deve basear-se preferencialmente num ajustamento simultâneo aos resultados das fases de absorção e de eliminação. A concentração do produto químico no interior ou à superfície dos vermes é monitorizada ao longo de ambas as fases do ensaio.
13. Durante a fase de absorção, são feitas medições a intervalos de amostragem que podem chegar a 14 dias (família *Enchytraeidae*) ou a 21 dias (minhocas) até ser atingido o estado estacionário (11)(12)(67). O estado estacionário ocorre quando o gráfico da concentração nos vermes em função do tempo é paralelo ao eixo do tempo, e três análises sucessivas da concentração feitas em amostras colhidas a intervalos de pelo menos dois dias variam entre si, no máximo, 20 %, com base em comparações estatísticas (p. ex., análise da variância, análise de regressão).
14. A fase de eliminação consiste em transferir os organismos sujeitos ao ensaio para recipientes que contêm o mesmo substrato, mas sem o produto químico em estudo. Durante a fase de eliminação, são feitas medições a intervalos de amostragem que podem chegar a 14 dias (família *Enchytraeidae*) ou a 21 dias (minhocas), a menos que determinações analíticas anteriores tenham mostrado uma redução de 90 % dos resíduos do produto químico nos vermes. A concentração do produto químico nos vermes no final da fase de eliminação é indicada como correspondente a resíduos não eliminados. O fator de bioacumulação em estado estacionário ( $BAF_{ss}$ ) é calculado preferencialmente como quociente entre a concentração nos vermes ( $C_a$ ) e a concentração no solo ( $C_s$ ) em estado estacionário aparente e também como fator de bioacumulação cinético,  $BAF_k$ , dado pelo quociente entre a constante de velocidade de absorção do solo ( $k_a$ ) e a constante de velocidade de eliminação ( $k_e$ ) (ver definições no apêndice 1), assumindo uma cinética de primeira ordem (ver cálculos no apêndice 2). Se a cinética de primeira ordem for manifestamente inaplicável, devem ser empregues outros modelos.
15. A constante de velocidade de absorção, a constante de velocidade de eliminação (ou as constantes, se forem utilizados outros modelos), o fator de bioacumulação cinético ( $BAF_k$ ) e, se possível, os limites de confiança de cada um destes parâmetros são calculados por meios informáticos a partir de equações de modelo (ver orientações no apêndice 2). A adequação de um modelo pode ser determinada a partir, por exemplo, do coeficiente de correlação ou do coeficiente de determinação (coeficientes próximos de 1 indicam boa adequação) ou da lei do qui-quadrado. A amplitude do erro-padrão ou do limite de confiança dos parâmetros estimados pode também dar uma boa indicação da adequação do modelo.
16. Para reduzir a variabilidade dos resultados dos ensaios de produtos químicos muito lipofílicos, os fatores de bioacumulação devem ser expressos em relação ao teor de lípidos e ao teor de carbono orgânico (kg de carbono orgânico no solo.  $kg^{-1}$  de lípidos nos vermes). Esta abordagem baseia-se no facto de que, para algumas classes de produtos químicos, há uma relação clara entre o potencial de bioacumulação e a lipofilia, relação essa bem

estabelecida no caso dos peixes (47). Há uma relação entre o teor de lípidos dos peixes e a bioacumulação dos produtos químicos em causa. Em organismos bentónicos, foram descobertas correlações similares — p. ex., 30 e 44. Esta correlação foi igualmente demonstrada em oligoquetas terrestres — p. ex., 5, 6, 7 e 14. Se se dispuser de tecido suficiente, o teor de lípidos dos vermes sujeitos ao ensaio pode ser determinado na mesma matéria biológica utilizada para determinar a concentração do produto químico em estudo. Alternativamente, podem utilizar-se animais de controlo para medir o teor de lípidos.

#### VALIDADE DOS ENSAIOS

17. Para que um ensaio seja válido, devem ser cumpridos os seguintes critérios, quer por parte dos organismos de controlo quer por parte dos organismos expostos:
- no final do ensaio, a mortalidade total durante as fases de absorção e de eliminação não pode exceder 10 % (minhocas) ou 20 % (família *Enchytraeidae*) do número total de vermes introduzidos;
  - para *Eisenia fetida* e *E. andrei*, a perda média de massa, medida no final da fase de absorção e no final da fase de eliminação, não pode exceder 20 % da massa fresca inicial da respetiva fase.

#### DESCRIÇÃO DO MÉTODO

##### Espécies sujeitas a ensaio

18. Para estudar a bioacumulação, recomenda-se várias espécies de oligoquetas terrestres. As mais utilizadas — *Eisenia fetida* ou *E. andrei* (família *Lumbricidae*) e *Enchytraeus albidus*, *E. crypticus* ou *E. luxuriosus* (família *Enchytraeidae*) — são descritas no apêndice 5.

##### Dispositivos

19. Deve ser evitada a utilização, em qualquer parte do equipamento, de materiais capazes de dissolver ou adsorver o produto químico em estudo ou de permitir fugas de outros produtos químicos ou que tenham um efeito adverso nos animais sujeitos ao ensaio. Servem recipientes normalizados retangulares ou cilíndricos, de materiais quimicamente inertes e com capacidade adequada à carga, isto é, ao número de vermes sujeitos ao ensaio. Pode ser utilizado aço inoxidável, plástico ou vidro em qualquer equipamento que entre em contacto com os meios de ensaio. Os recipientes de ensaio devem ser adequadamente cobertos para impedir a fuga dos vermes, mas permitindo uma entrada de ar suficiente. No caso de produtos químicos com coeficiente de adsorção elevado, como os piretroides sintéticos, pode ser necessário vidro silanizado. Em tais situações, importa descartar o equipamento após a utilização (49). Devem ser impedidas fugas de produtos químicos com marcação radioativa e de produtos químicos voláteis. Devem ser utilizadas armadilhas (por exemplo, garrafas de vidro para lavagem de gases) contendo absorventes capazes de reter os resíduos que se evaporam dos recipientes de ensaio.

##### Solo

20. A qualidade do solo ensaiado deve permitir a sobrevivência e, preferivelmente, a reprodução dos organismos durante os períodos de aclimação e de ensaio, sem apresentarem aspeto ou comportamento anormal. É necessário que os vermes se entrem no solo.
21. Como substrato para o ensaio é recomendado o solo artificial descrito no capítulo C.8 deste anexo — (48). No apêndice 4 é descrita a preparação do solo artificial a utilizar nos ensaios de bioacumulação e são feitas recomendações sobre a armazenagem de solos artificiais. O solo artificial seco ao ar pode ser armazenado à temperatura ambiente até à sua utilização.
22. Contudo, também solos naturais de locais não poluídos podem servir para ensaio e/ou para cultura. Devem conhecer-se, no mínimo, as suas características seguintes: origem (local de recolha), pH, teor de carbono orgânico, distribuição granulométrica (percentagem de areia, de limo e de argila), capacidade máxima de retenção de água ( $WHC_{max}$ ) e teor percentual de água (3). A pesquisa de micropoluentes no solo ou nos seus componentes antes da utilização deverá proporcionar informações úteis. Caso se utilize solo natural proveniente de terras agrícolas, as amostras não devem ser colhidas menos de um ano após o último tratamento com produtos fitofarmacêuticos ou da última aplicação de estrume de animais, nem menos de seis meses após o último tratamento com fertilizantes orgânicos (50). Na referência 3 são descritos procedimentos de manipulação de solos naturais antes da sua utilização em ensaios laboratoriais de ecotoxicologia com oligoquetas. O tempo de armazenagem de solos naturais em laboratório deve ser o mais curto possível.

##### Aplicação do produto químico em estudo

23. O produto químico é incorporado no solo. As suas propriedades físico-químicas devem ser tidas em conta. Os produtos químicos hidrossolúveis devem ser completamente dissolvidos em água antes da sua mistura com o solo. O procedimento de enriquecimento recomendado para produtos químicos pouco hidrossolúveis consiste em incorporar o produto químico em estudo num ou mais dos componentes do solo (artificial). Por exemplo, a areia quartzítica (ou uma parte dela) pode ser embebida numa solução do produto químico com um solvente

orgânico adequado que, em seguida, é lentamente evaporado até a areia secar. A fração impregnada pode então ser misturada com o solo humedecido. A grande vantagem deste procedimento é que não se introduz nenhum solvente no solo. Se for utilizado solo natural, o produto químico em estudo pode ser adicionado enriquecendo, pelo método atrás descrito para solo artificial, uma porção do solo seca ao ar, ou misturando o produto químico no solo húmido, com subsequente evaporação se se tiver utilizado um agente solubilizante. Em geral, deve evitar-se o mais possível o contacto de solo húmido com solventes. Ter em conta o seguinte (3):

- se se utilizar um solvente que não água, importa que seja hidromiscível e/ou possa ser removido (por evaporação, por exemplo), deixando no solo apenas o produto químico em estudo,
  - se se recorrer a um controlo do solvente, não é necessário controlo negativo. O controlo do solvente deve conter a mais elevada concentração de solvente adicionado ao solo e utilizar solvente do mesmo lote que serviu para preparar a solução-mãe. A toxicidade e a volatilidade do solvente e a solubilidade do produto químico em estudo no solvente escolhido devem ser os critérios principais para a seleção de um agente solubilizante adequado.
24. No caso dos produtos químicos pouco solúveis em água ou em solventes orgânicos, podem misturar-se (com almofariz e pilão, por exemplo,) 2,0-2,5 g de areia quartzítica finamente moída por cada recipiente de ensaio com a quantidade do produto químico em estudo, até obter a concentração de ensaio desejada. Esta mistura de areia quartzítica e produto químico é misturada cuidadosamente com o solo previamente humedecido, adicionando água desionizada até obter o teor de humidade necessário. A mistura final é distribuída pelos recipientes de ensaio. Repete-se o procedimento para cada concentração de ensaio e prepara-se também um controlo adequado, com 2,0-2,5 g de areia quartzítica finamente moída em cada recipiente.
25. Após o enriquecimento, determina-se a concentração do produto químico no solo. A distribuição homogénea do produto no solo deve ser verificada antes de se introduzirem os organismos que vão ser sujeitos ao ensaio. Deve indicar-se o método utilizado para o enriquecimento, bem como as razões da escolha de um determinado procedimento de enriquecimento (24).
26. Antes de se adicionar os organismos, deve, idealmente, estabelecer-se um equilíbrio entre o solo e a água intersticial, para o que se recomenda um período de quatro dias a 20 °C. Para muitos produtos químicos orgânicos pouco hidrossolúveis, o tempo necessário para alcançar um verdadeiro equilíbrio entre as frações adsorvida e dissolvida pode ser de dias ou meses. Dependendo da finalidade do estudo — por exemplo, quando se trata de imitar as condições ambientais —, o solo enriquecido poderá ter de ser "envelhecido" por um período mais longo — por exemplo, no caso dos metais, três semanas a 20 °C (22).

#### **Cultura dos organismos a ensaiar**

27. De preferência, deve ter-se uma cultura permanente dos vermes no laboratório. O apêndice 5 dá orientações sobre métodos de cultura laboratorial de *Eisenia fetida* e de *E. andrei*, bem como de espécies da família *Enchytraeidae* — ver também 48, 51 e 52.
28. Os vermes utilizados nos ensaios devem estar isentos de doenças, anomalias e parasitas visíveis.

#### **REALIZAÇÃO DO ENSAIO**

29. Os organismos sujeitos a ensaio são expostos ao produto químico em estudo durante a fase de absorção, que deve durar 14 dias (família *Enchytraeidae*) ou 21 dias (minhocas), a menos que se demonstre que o estado estacionário foi alcançado.
30. Para a fase de eliminação, os vermes são transferidos para um solo isento do produto químico em estudo. A primeira amostra deve ser colhida entre 4 e 24 horas após o início da fase de eliminação. O apêndice 3 contém exemplos de programação da colheita de amostras para uma fase de absorção de 21 dias e uma fase de eliminação de 21 dias.

#### **Organismos sujeitos aos ensaios**

31. Em muitas espécies terrestres da família *Enchytraeidae*, a massa individual é bastante baixa (por exemplo, 5-10 mg de massa húmida por indivíduo no caso de *Enchytraeus albidus* e menos no caso de *E. crypticus* ou *E. luxuriosus*). Para efetuar as pesagens e as análises químicas, pode ser necessário juntar os vermes de cada recipiente de replicação (ou seja, todos os vermes de um recipiente de replicação para se obter um resultado único de análise de tecido). A cada replicado são adicionados vinte espécimes de *Enchytraeidae*, devendo ser utilizados pelo menos três replicados. Se o limite de deteção analítico do produto químico em estudo for elevado, poderão ser necessários mais vermes. Para as espécies com maior massa individual (*Eisenia fetida* e *E. andrei*), podem ser utilizados recipientes de replicação com um só espécime.
32. As minhocas utilizadas num ensaio devem ter massa similar (por exemplo, cada espécime de *Eisenia fetida* e *E. andrei* deve ter massa de 250-600 mg). Os espécimes da família *Enchytraeidae* (por exemplo, da espécie *Enchytraeus albidus*) devem ter um comprimento de aproximadamente 1 cm. Todos os vermes utilizados num ensaio devem provir da mesma fonte e ser adultos com clitélio (ver apêndice 5). Uma vez que a massa e a idade do

animal podem ter influência nos valores do BAF (por exemplo, devido a variações no teor de lípidos e/ou à presença de ovos), tais parâmetros devem ser registados com exatidão e tidos em conta na interpretação dos resultados. Por outro lado, durante o período de exposição, podem surgir casulos de ovos, o que terá também efeito nos valores do BAF. Recomenda-se a pesagem de uma subamostra dos vermes antes do ensaio, a fim de estimar os valores médios da massa húmida e da massa seca.

33. Deve utilizar-se um rácio elevado solo/vermes, a fim de minimizar o decréscimo da concentração do produto químico no solo durante a fase de absorção. Para as espécies *Eisenia fetida* e *E. andrei*, recomenda-se um valor mínimo de 50 g de massa seca de solo por cada verme e, para a família *Enchytraeidae*, um mínimo de 10-20 g de massa seca de solo por cada recipiente de ensaio. Os recipientes devem conter uma camada de solo de 2-3 cm no caso de vermes da família *Enchytraeidae* ou de 4-5 cm no caso das minhocas.
34. Os vermes a ensaiar são retirados da cultura (no caso da família *Enchytraeidae*, por exemplo, com recurso a pinças de joalheiro). Transfere-se animais adultos para solo não tratado, para aclimação, e alimentam-se (cf. ponto 36). Se as condições de ensaio diferirem das condições de cultura, deverá ser suficiente uma fase de aclimação de 24-72 horas para adaptar os vermes às condições de ensaio. Terminada a aclimação, os vermes são transferidos para vasos de vidro (por exemplo, placas de Petri) com água limpa, para ser lavados, e em seguida são pesados, antes da sua colocação no solo de ensaio. Antes da pesagem, a água em excesso deve ser removida dos vermes, percutindo-os delicadamente contra as bordas da placa ou secando-os com cuidado por meio de um toalhete de papel ligeiramente humedecido.
35. Deve observar-se e registar-se o comportamento dos organismos sujeitos a ensaio, em termos de enterramento no solo. Nos ensaios com minhocas, os animais (de controlo ou expostos) enterram-se normalmente ao cabo de algumas horas; este comportamento deve ser confirmado, o mais tardar, 24 h após a colocação dos vermes nos recipientes de ensaio. Se as minhocas não se enterrarem (por exemplo, mais de 10 % delas ao cabo de mais de metade da fase de absorção), é sinal de que as condições do ensaio não são adequadas ou de que as minhocas não estão saudáveis. Nesse caso, o ensaio deve ser interrompido e repetido. Os vermes da família *Enchytraeidae* vivem sobretudo nos poros intersticiais do solo e é frequente o seu tegumento estar só parcialmente em contacto com o substrato circundante; considera-se que, nesta família, a exposição dos vermes que se enterram é equivalente à dos que não se enterram, pelo que a ausência de enterramento não exige necessariamente a repetição do ensaio.

#### Alimentação

36. É necessário alimentar os vermes quando se utiliza um solo com baixo teor de carbono orgânico total. Caso se utilize um solo artificial, recomenda-se uma frequência de alimentação semanal (ou seja, os vermes são alimentados uma vez por semana), com 7 mg de estercor seco por 1 g de solo seco no caso das minhocas e com 2-2,5 mg de flocos de aveia moídos por 1 g de solo seco no caso da família *Enchytraeidae* (11). A primeira ração alimentar deve ser misturada com o solo imediatamente antes da colocação dos organismos a ensaiar. É preferível utilizar o mesmo tipo de alimento que nas culturas (ver apêndice 5).

#### Luz e temperatura

37. Os ensaios devem ser realizados segundo um ciclo controlado de 16 horas de luz e 8 de obscuridade, preferencialmente com uma intensidade de 400-800 lx na zona dos recipientes de ensaio (3). A temperatura deve ser de  $20 \pm 2$  °C ao longo de todo o ensaio.

#### Concentrações de ensaio

38. É utilizada uma única concentração. As situações em que se exijam concentrações adicionais devem ser justificadas. Se a toxicidade ( $CE_{50}$ ) do produto químico em estudo for próxima do limite de deteção analítico, recomenda-se a utilização de um produto químico marcado radioativamente com elevada radioatividade específica. Para metais, a concentração deve ser superior ao nível de fundo nos tecidos e no solo.

#### Replicados

39. Para as medições cinéticas (fase de absorção e fase de eliminação), o número mínimo de recipientes de replicação expostos é de três por cada ponto de amostragem. O número total de replicados preparados deve ser suficiente para abranger todos os tempos de amostragem durante a fase de absorção e a fase de eliminação.
40. Para as observações e medições biológicas (quociente entre massa seca e massa húmida, teor de lípidos, etc.) e para a análise das concentrações de fundo nos vermes e no solo, devem ser constituídos pelo menos doze recipientes de replicação de um controlo negativo (colheita de amostras em quatro recipientes no início da fase de absorção, em quatro no final da fase de absorção e em quatro no final da fase de eliminação), se não tiver sido utilizado outro solvente além da água. Se for utilizado um qualquer agente solubilizante para a aplicação do produto químico em estudo, deve-se ensaiar, além dos replicados expostos, um controlo do solvente (colheita de amostras em quatro recipientes de replicação no início da fase de absorção, em quatro no final da fase de absorção e em quatro no final da fase de eliminação), contendo todos os componentes, com exceção do produto químico em estudo. Neste caso, podem também ser constituídos quatro recipientes de replicação adicionais de um controlo negativo (sem solvente), para amostragem opcional no final da fase de absorção. Estes replicados podem ser comparados biologicamente com o controlo do solvente a fim de obter informações sobre uma eventual influência do solvente nos organismos sujeitos ao ensaio. Recomenda-se a constituição de um número suficiente de recipientes de replicação adicionais de reserva (por exemplo, oito) para exposição e controlo(s).

#### Frequência das medições da qualidade do solo

41. No início e no final da fase de absorção e da fase de eliminação medem-se o pH e o teor de humidade do solo. A temperatura no local do ensaio é medida continuamente. O teor de humidade do solo deve ser verificado uma vez por semana, pesando os recipientes de ensaio e comparando as massas obtidas com as massas iniciais (isto é, no início do ensaio). As perdas de água devem ser repostas com água desionizada.

#### Colheita de amostras e análise dos vermes e do solo

42. O apêndice 3 contém exemplos de programação da colheita de amostras para a fase de absorção e para a fase de eliminação em ensaios de bioacumulação realizados com minhocas e com vermes da família *Enchytraeidae*.
43. Antes da colocação dos vermes, durante a fase de absorção e durante a fase de eliminação, colhe-se amostras de solo dos recipientes de ensaio para determinar a concentração do produto químico em estudo. Durante o ensaio, determina-se as concentrações do produto químico nos vermes e no solo. Em geral, mede-se as concentrações totais no solo. Facultativamente, pode medir-se as concentrações na água intersticial, caso em que, antes do início do estudo, deve conhecer-se os fundamentos disso e deve dispor-se dos métodos adequados (elementos a incluir posteriormente no relatório).
44. Colhe-se amostras dos vermes e do solo em, pelo menos, seis ocasiões durante a fase de absorção e a fase de eliminação. Se a estabilidade do produto químico em estudo for demonstrada, pode reduzir-se o número de análises ao solo. Recomenda-se a análise de, pelo menos, três replicados no início e no final da fase de absorção. Se a concentração no solo medida no final da fase de absorção diferir em mais de 30 % da medida no início, devem também ser analisadas as amostras de solo colhidas noutras datas.
45. A cada tempo de colheita de amostras, os vermes do replicado em causa são retirados do solo (por exemplo, espalhando o solo do replicado sobre um tabuleiro raso e colhendo os vermes com pinças de joalheiro) e lavados rapidamente em água num tabuleiro raso de vidro ou aço. Remove-se a água em excesso (cf. ponto 34). Transfere-se os vermes cuidadosamente para um recipiente previamente tarado e pesando-se de imediato, incluindo o conteúdo do trato digestivo.
46. No caso das minhocas (*Eisenia* sp.), deixam-se evacuar o trato digestivo de um dia para o outro — por exemplo, sobre papel de filtro humedecido, numa placa de Petri coberta (cf. ponto 34). Após essa purga, determina-se a massa dos vermes, a fim de avaliar um eventual decréscimo da biomassa durante o ensaio (ver critérios de validade no ponto 17). No caso dos vermes da família *Enchytraeidae*, a pesagem e a análise de tecidos são efetuadas sem purga do trato digestivo, por esta ser tecnicamente difícil devido às pequenas dimensões destes animais. Terminada a pesagem final, os vermes devem ser occisados de imediato, pelo método mais adequado (por exemplo, com azoto líquido ou por congelamento a temperaturas inferiores a -18 °C).
47. Durante a fase de eliminação, os vermes substituem o conteúdo contaminado do trato digestivo por solo limpo. Quer isto dizer que, no caso de animais que não purgaram o trato digestivo (vermes da família *Enchytraeidae*, neste caso) integrantes de amostras colhidas imediatamente antes da fase de eliminação, as medições incluem solo contaminado presente no trato digestivo. Em relação aos oligoquetas aquáticos, considera-se que, após as primeiras 4 a 24 horas da fase de eliminação, a maior parte do conteúdo contaminado do trato digestivo foi substituída por sedimento limpo — p. ex., 46. Observou-se o mesmo em minhocas em estudos sobre a acumulação de cádmio e zinco com marcação radioativa (78). Nos vermes da família *Enchytraeidae*, que não purgaram o trato digestivo, a concentração desta primeira amostra da fase de eliminação pode ser considerada como concentração nos tecidos após purga do trato digestivo. Para atender à diluição da concentração do produto químico em estudo por solo não contaminado, durante a fase de eliminação, a massa do conteúdo do trato digestivo pode ser estimada a partir do quociente entre a massa húmida de vermes e a massa das suas cinzas ou do quociente entre a massa seca de vermes e a massa das suas cinzas.
48. As amostras de solo e de vermes devem, de preferência, ser analisadas imediatamente após a remoção (ou seja, no prazo de um a dois dias), a fim de evitar degradações ou outras perdas, e é recomendável calcular as velocidades aproximadas de absorção e de eliminação no decurso do ensaio. Se a análise for adiada, as amostras devem ser armazenadas por um método adequado — por exemplo, ultracongelamento ( $\leq -18$  °C).
49. Deve confirmar-se se a precisão e a reprodutibilidade da análise química, bem como a recuperação do produto químico em estudo das amostras de solo e das amostras de vermes, são satisfatórias para o método em questão. Devem indicar-se a eficácia da extração, o limite de deteção e o limite de quantificação. Do mesmo modo, deve confirmar-se que o produto químico em estudo não é detetável nos recipientes de controlo em concentrações superiores ao nível de fundo. A concentração do produto químico em estudo ( $C_a$ ), se for  $> 0$  nos vermes de controlo, deve ser incluída no cálculo dos parâmetros cinéticos (cf. apêndice 2). Ao longo de todo o ensaio, as amostras devem ser manipuladas de modo a minimizar contaminações e perdas (resultantes, por exemplo, da adsorção do produto químico em estudo no dispositivo de colheita das amostras).

50. Caso se estude um produto químico com marcação radioativa, é possível analisar o produto químico parental e os seus metabolitos. A determinação quantitativa do produto químico parental e dos seus metabolitos em estado estacionário ou no final da fase de absorção fornece informações importantes. As amostras devem então ser limpas, para que possa determinar-se quantitativamente apenas o produto químico parental. Se a um único metabolito corresponderem mais de 10 % da radioatividade total na(s) amostra(s) analisada(s), é recomendável identificá-lo.
51. Devem ser registadas e indicadas a recuperação global e a recuperação do produto químico nos vermes, no solo e em eventuais armadilhas com absorventes para reter o produto químico evaporado.
52. O agrupamento dos espécimes que constituem a amostra colhida num determinado recipiente de ensaio é aceitável em relação aos vermes da família *Enchytraeidae*, que são menores do que as minhocas. Se o agrupamento implicar a redução do número de replicados, os procedimentos estatísticos aplicáveis aos dados sofrerão limitações. Se forem exigíveis um procedimento estatístico e uma representatividade estatística específicos, deve ser utilizado no ensaio um número de recipientes de replicação adequado ao agrupamento, ao procedimento e à representatividade pretendidos.
53. Recomenda-se que o BAF seja expresso em função da massa seca total e, quando necessário (ou seja, no caso de produtos químicos muito hidrofóbicos), também em função do teor de lípidos. Devem ser utilizados métodos adequados para determinar o teor de lípidos (alguns dos métodos existentes — p. ex., 31 e 58 — têm de ser adaptados para o efeito). Estes métodos recorrem a uma técnica de extração com clorofórmio/metanol. No entanto, para evitar os solventes clorados, deve utilizar-se uma versão modificada do método de Bligh e Dyer (9), descrita na referência (17). Como os vários métodos podem não conduzir a resultados idênticos, importa explicar o método utilizado. Sempre que possível, isto é, quando se dispuser de tecido suficiente, a análise dos lípidos deve, idealmente, ser feita na mesma amostra ou no mesmo extrato que a análise do produto químico em estudo, porquanto os lípidos têm frequentemente de ser removidos do extrato antes de este poder ser analisado cromatograficamente (49). Alternativamente, pode utilizar-se animais de controlo para medir o teor de lípidos, que serve em seguida para normalizar os valores do BAF. Esta última metodologia reduz a contaminação do equipamento com o produto químico em estudo.

#### DADOS E RELATÓRIOS

##### Tratamento dos resultados

54. A curva de absorção do produto químico em estudo é obtida exprimindo em função do tempo a concentração do produto no interior ou à superfície dos vermes durante a fase de absorção, em escalas aritméticas. Quando a curva atinge um patamar ou estado estacionário (ver definições no apêndice 1), calcula-se o fator de bioacumulação em estado estacionário  $BAF_{ss}$  pela seguinte fração:

$$\frac{C_a \text{ em estado estacionário ou no final da fase de absorção (média)}}{C_s \text{ em estado estacionário ou no final da fase de absorção (média)}}$$

$C_a$   $C_a$  é a concentração do produto químico em estudo no organismo sujeito ao ensaio;

$C_s$   $C_s$  é a concentração do produto químico em estudo no solo.

55. Se não for atingido estado estacionário (ou seja, se a curva não atingir um patamar), deve ser determinado o  $BAF_K$ , baseado nas constantes de velocidade, em vez do  $BAF_{ss}$ , como se segue:

— determina-se o fator de acumulação ( $BAF_K$ ) como quociente  $k_s/k_e$ ,

— de preferência, as velocidades de absorção e de eliminação calculam-se simultaneamente (cf. equação 11 no apêndice 2),

— a constante de velocidade de eliminação ( $k_e$ ) é normalmente determinada a partir da curva de eliminação (ou seja, da linha que representa a concentração do produto químico nos vermes durante a fase de eliminação). A constante de velocidade de absorção ( $k_s$ ) é então calculada em função de  $k_e$  e de um valor de  $C_a$  derivado da curva de absorção — ver no apêndice 2 uma descrição destes métodos. Para obter o fator  $BAF_K$  e as constantes de velocidade  $k_s$  e  $k_e$ , é preferível recorrer a métodos informáticos de estimativa de parâmetros não lineares. Se, manifestamente, a curva de eliminação não obedecer a uma cinética de primeira ordem, devem ser utilizados modelos mais complexos.

##### Relatório dos ensaios

56. Elementos a constar do relatório dos ensaios:

*Produto químico em estudo:*

- todas as informações disponíveis sobre toxicidade aguda e a longo prazo (p. ex.,  $CE_x$ ,  $CL_x$ , NOEC) para oligoquetas que vivem no solo,
- grau de pureza, estado físico e propriedades físico-químicas — p. ex.,  $\log K_{ow}$ , hidrossolubilidade,
- dados de identificação química: proveniência do produto químico em estudo, identidade e concentração dos solventes eventualmente utilizados,
- se o produto químico tiver marcação radioativa, a posição precisa dos átomos marcados, a radioatividade específica e a pureza radioquímica.

*Espécies sujeitas ao ensaio:*

- denominação científica, estirpe, origem, pré-tratamentos eventuais, aclimação, idade, gama de dimensões, etc.

*Condições de realização dos ensaios:*

- procedimento de ensaio utilizado,
- tipo e características da iluminação utilizada e fotoperíodo(s),
- protocolo do ensaio (por exemplo, número e tamanho dos recipientes, massa de solo e espessura da camada de solo, número de replicados, número de vermes por replicado, número de concentrações de ensaio, duração da fase de absorção e da fase de eliminação, frequência da colheita de amostras),
- justificação da escolha do material dos recipientes de ensaio,
- método de preparação e aplicação do produto químico em estudo e razões da escolha desse método,
- concentrações de ensaio nominais, bem como as médias e os desvios-padrão dos valores medidos nos recipientes de ensaio e o método de obtenção desses valores,
- origem dos componentes do solo artificial ou — se se utilizar um meio natural — origem do solo, descrição de eventuais pré-tratamentos, resultados dos controlos (sobrevivência, evolução da biomassa, reprodução), características do solo — pH, teor de carbono orgânico total, distribuição granulométrica (percentagem de areia, de limo e de argila), capacidade máxima de retenção de água, teor percentual de água no início e no final do ensaio e quaisquer outras medições efetuadas,
- explicação do tratamento das amostras de solo e de vermes, incluindo elementos sobre a preparação, a armazenagem, os procedimentos de enriquecimento do solo com o produto químico em estudo, a extração, os procedimentos de análise (e sua precisão) do produto químico nos vermes e no solo, o teor de lípidos (se for medido) e as recuperações do produto químico em estudo.

*Resultados:*

- mortalidade dos vermes de controlo e dos vermes de cada recipiente de ensaio e eventuais comportamentos anormais observados (por exemplo, os vermes evitam o solo, não se verifica a reprodução de vermes da família *Enchytraeidae* num ensaio de bioacumulação, etc.),
- quociente entre massa seca e massa húmida, quer do solo quer dos organismos sujeitos ao ensaio (útil para a normalização),
- massa húmida dos vermes em cada tempo de colheita de amostras; no caso das minhocas, a massa húmida no início do ensaio e em cada tempo de colheita de amostras antes e depois da purga do trato digestivo,
- teor de lípidos dos organismos sujeitos ao ensaio (se for medido),

- curvas indicando a cinética de absorção e de eliminação do produto químico nos vermes e o intervalo de tempo até ao estado estacionário,
- $C_a$  e  $C_s$  (com desvio-padrão e intervalo, se for caso disso) para cada tempo de colheita de amostras ( $C_a$  expressa em g por kg de massa húmida e de massa seca do corpo inteiro;  $C_s$  expressa em g por kg de massa húmida e por kg de massa seca do solo). Se for necessário um fator de acumulação biota-solo (BSAF) (por exemplo, para comparação dos resultados de dois ou mais ensaios realizados em animais com diferentes teores de lípidos),  $C_a$  pode também ser expressa em g por kg de lípidos do organismo e  $C_s$  pode ser expressa em g por kg de carbono orgânico do solo,
- BAF (expresso em kg de solo por kg de vermes), constante de velocidade de absorção do solo ( $k_s$ , expressa em g de solo por kg de vermes por dia) e constante de velocidade de eliminação ( $k_e$ , expressa em  $\text{dia}^{-1}$ ); adicionalmente, pode indicar-se o BSAF (expresso em kg de carbono orgânico do solo por kg de lípidos dos vermes),
- se tiverem sido medidas: percentagens do produto químico parental, dos metabolitos deste e dos resíduos ligados (ou seja, percentagem do produto químico em estudo que não pode ser extraído por métodos de extração comuns) detetadas no solo e nos animais sujeitos ao ensaio,
- métodos utilizados para as análises estatísticas dos dados.

*Avaliação dos resultados:*

- coerência dos resultados com os critérios de validade referidos no ponto 17,
- resultados inesperados ou inabituais — por exemplo, eliminação incompleta do produto químico pelos animais sujeitos ao ensaio.

REFERÊNCIAS:

- (1) Amorim M. (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane ( $\gamma$ -HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*. Tese de mestrado, Universidade de Coimbra.
- (2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.
- (3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 pp.
- (4) Beek B., Boehling S., Bruckmann U., Franke C., Joehncke U., Studinger G. (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), *The Handbook of Environmental Chemistry*, vol. 2, parte J (editordo volume: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (5) Belfroid A., Sikkenk M., Seinen W., Van Gestel C., Hermens J. (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 93-99.
- (6) Belfroid A., Van Wezel A., Sikkenk M., Van Gestel C., Seinen W. e Hermens J. (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. *Ecotox. Environ. Safety* 25: 154-165.
- (7) Belfroid A., Meiling J., Drenth H., Hermens J., Seinen W., Van Gestel C. (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). *Ecotox. Environ. Safety* 31: 185-191.
- (8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. *Ann. Mus. Novitat.* 1902: 1-13.
- (9) Bligh E.G. e Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Pysiol.* 37: 911-917.
- (10) Bouche M. (1972). *Lombriciens de France. Écologie et Systématique*. INRA, Annales de Zoologie-Écologie animale, Paris, 671 p.



- (11) Bruns E., Egeler Ph., Moser T., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Relatório à Agência Federal Alemã do Ambiente (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.
- (12) Bruns E., Egeler Ph., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). *Hydrobiologia* 463: 185-196.
- (13) Conder J.M. e Lanno R.P. (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. *J. Soils Sediments* 3: 13-20.
- (14) Connell D.W. e Markwell R.D. (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. *Chemosphere* 20: 91-100.
- (15) Didden W.A.M. (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37: 2-29.
- (16) Didden W. (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert B.A., Breure A.M. e Zechmeister H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., Países Baixos, p. 555-576.
- (17) De Boer J., Smedes F., Wells D., Allan A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (18) Dietrich D.R., Schmid P., Zweifel U., Schlatter C., Jenni-Eiermann S., Bachmann H., Bühler U., Zbinden N. (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 140-145.
- (19) Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de dezembro de 2006, relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH), que cria a Agência Europeia dos Produtos Químicos, que altera a Directiva 1999/45/CE e que revoga o Regulamento (CEE) n.º 793/93 do Conselho e o Regulamento (CE) n.º 1488/94 da Comissão, bem como a 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).
- (20) Edwards C.A. e Bohlen P.J. (1996). Biology and ecology of earthworms. Terceira edição, Chapman & Hall, Londres, 426 pp.
- (21) OCDE (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes, Guideline No 315, Guidelines for the testing of chemicals. OCDE, Paris
- (22) Egeler Ph., Gilberg D., Scheffczyk A., Moser Th. e Römbke J. (2009). Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten. Relatório à Agência Federal Alemã do Ambiente (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf>.
- (23) Elmegaard N. e Jagers op Akkerhuis G.A.J.M. (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.
- (24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Relatório de série sobre a proteção do ambiente EPS 1/RM/30.
- (25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, Normas da EPPO (European Plant Protection Organization), Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.
- (26) Franke C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* 32: 1897-1905.

- (27) Franke C., Studinger G., Berger G., Böhling S., Bruckmann U., Cohors-Fresenborg D., Jöhncke U. (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29: 1501-1514.
- (28) Füll C. (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (*Oligochaeta, Lumbricidae*). Dissertação na Universidade de Mogúncia, 156 pp.
- (29) Füll C., Schulte C., Kula C. (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF-Z. *Umweltchem, Ökotox.* 15: 78-84.
- (30) Gabric A.J., Connell D.W., Bell P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24: 1225-1231.
- (31) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A., Parrish C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography* 30: 1099-1105.
- (32) Hawker D.W. e Connell D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
- (33) Hund-Rinke K. e Wiechering H. (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. *J. Soils Sediments* 1: 15-20.
- (34) Hund-Rinke K., Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: *Toxikologische Beurteilung von Böden*. Heiden S., Erb R., Dott W., Eisentraeger A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.
- (35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.
- (36) Jaenike J. (1982). *Eisenia foetida* is two biological species. *Megadrilologica* 4: 6-8.
- (37) Jager T. (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (*Oligochaeta*). *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2080-2090.
- (38) Jager T., Sanchez P.A., Muijs B., van der Welde E., Posthuma L. (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (*Oligochaeta*) using spiked soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 953-961.
- (39) Jager T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A.C., Hogendoorn E.A., De Jong A., Kruitbosch J.A.W., Peijnenburg W.J.G. M. (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, *Oligochaeta*) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 767-775.
- (40) Jager T., Fleuren R.L.J., Hoogendoorn E., de Korte G. (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (*Oligochaeta*). *Environ. Sci. Technol.* 37: 3399-3404.
- (41) Janssen M.P.M., Bruins A., De Vries T.H., Van Straalen N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (42) Kasprzak K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23: 217-232.
- (43) Khalil A.M. (1990). Aufnahme und Metabolismus von <sup>14</sup>C-Hexachlorbenzol und <sup>14</sup>C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertação na Universidade de Munique, 137 pp.
- (44) Landrum P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23: 588-595.

- (45) Marinussen M.P.J.C., Van der Zee S.E.A.T.M., De Haan F.A. (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. *Ecotox. Environ. Safety* 36: 17-26.
- (46) Mount D.R., Dawson T.D., Burkhard L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1244-1249.
- (47) Nendza M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log  $K_{ow}$ /log BCF correlations, In: R. Nagel e R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.
- (48) Capítulo C.8 deste anexo — Toxicidade em relação às minhocas.
- (49) Capítulo C.13 deste anexo — Bioconcentração: ensaio dinâmico com peixe.
- (50) Capítulo C.21 deste anexo — Microorganismos no solo: ensaio de transformação de azoto.
- (51) OCDE (2004a), Enchytraeid reproduction test, *Test Guideline No 220, Guidelines for the testing of chemicals*, OCDE, Paris.
- (52) OCDE (2004b), *Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei)*, *Test Guideline No 222, Guidelines for the testing of chemicals*, OCDE, Paris.
- (53) OCDE (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes*, *Test Guideline No 315, Diretrizes para os ensaios a produtos químicos*, OCDE, Paris.
- (54) Petersen H. e Luxton M. (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388.
- (55) Phillips D.J.H. (1993). Bioaccumulation. In: *Handbook of Ecotoxicology Vol. 1*. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.
- (56) Pflugmacher J. (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffizienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.
- (57) Posthuma L., Weltje L., Anton-Sanchez F.A. (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. Relatório do RIVM n.º 607506001, Bilthoven.
- (58) Randall R.C., Lee II H., Ozretich R.J., Lake J.L., Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ.Toxicol. Chem.* 10: 1431-1436.
- (59) Römbke J., Egele P., Füll C. (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.
- (60) Römbke J. e Moser Th. (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.
- (61) Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: *Toxikologische Beurteilung von Böden*. Heiden S., Erb R., Dott W. e Eisentraeger A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.
- (62) Romijn C.A.F.M., Luttik R., Van De Meent D., Slooff W., Canton J.H. (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. *Ecotox. Envir. Safety* 27: 107-127.

- (63) Sample B.E., Suter D.W., Beauchamp J.J., Efroymson R.A. (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2110-2120.
- (64) Schlosser H.-J. e Riepert F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. *Zool. Beitr. NF* 34: 413-433.
- (65) Schmelz R. e Collado R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (*Enchytraeidae*, *Clitellata*, *Annelida*). *Carolinea* 57: 93-100.
- (66) Sims R.W. e Gerard B.M. (1985). Earthworms, In: Kermack D.M. e Barnes R.S.K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. Londres: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.
- (67) Sousa J.P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M. (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2557-2563.
- (68) Spacie A. e Hamelink J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (69) Stephenson G.L., Kaushik A., Kaushik N.K., Solomon K.R., Steele T., Scroggins R.P. (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.
- (70) Sterenborg I., Vork N.A., Verkade S.K., Van Gestel C.A.M., Van Straalen N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation – Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.
- (72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Segunda edição, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (73) Van Brummelen TC e Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.
- (74) Van Gestel C.A.M. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H. Edwards, P.J. Greig-Smith, P.W. & Heimbach F.). Intercept Press, Andover (GB).
- (75) Van Gestel C.A. e Ma W.-C. (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. *Chemosphere* 21: 1023-1033.
- (76) Van Straalen N.M., Donker M.H., Vijver M.G., van Gestel C.A.M. (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environmental Pollution* 136: 409-417.
- (77) Venter J.M. e Reinecke A.J. (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (*Oligochaeta*). *South African J. Zool.* 23: 161-165.
- (78) Vijver M.G., Vink J.P.M., Jager T., Wolterbeek H.T., van Straalen N.M., van Gestel C.A.M. (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1843-1851.
- (79) Widianarko B. e Van Straalen N.M. (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 402-406.
-

## Apêndice 1

## DEFINIÇÕES

**Bioacumulação** é o aumento que a concentração do produto químico em estudo sofre no interior ou à superfície de um organismo, relativamente à concentração do mesmo produto no meio circundante. A bioacumulação resulta dos processos de bioconcentração e bioamplificação (cf. *infra*).

**Bioconcentração** é o aumento que a concentração do produto químico em estudo sofre no interior ou à superfície de um organismo, em consequência da absorção do produto exclusivamente a partir do meio circundante (ou seja, através da superfície do corpo e através do solo ingerido), relativamente à concentração do mesmo produto no meio circundante.

**Bioamplificação** é o aumento que a concentração do produto químico em estudo sofre no interior ou à superfície de um organismo, sobretudo em consequência da absorção de alimentos ou presas contaminados, relativamente à concentração do mesmo produto nesses alimentos ou presas. A bioamplificação pode conduzir à transferência do produto químico para as cadeias alimentares, com acumulação.

**Eliminação** de um produto químico em estudo é a perda desse produto pelos tecidos do organismo sujeito ao ensaio, mediante processos ativos ou passivos, perda essa que ocorre independentemente da presença ou ausência do produto químico no meio circundante.

**Fator de bioacumulação** (BAF) em qualquer momento da fase de absorção deste ensaio de bioacumulação é o quociente entre a concentração do produto químico no interior ou à superfície do organismo sujeito ao ensaio ( $C_a$  — em g por kg de massa seca de verme) e a concentração do produto químico no meio circundante ( $C_s$  — em g por kg de massa seca de solo); as unidades em que se exprime o BAF são kg de solo por kg de verme.

**Fator de bioacumulação em estado estacionário** ( $BAF_{ss}$ ) é o BAF em estado estacionário, sem variação significativa ao longo de um período prolongado, mantendo-se constante durante esse período a concentração do produto químico no meio circundante ( $C_s$  — em g por kg de massa seca de solo).

O **fator de bioacumulação**, quando calculado diretamente pelo quociente entre a constante de velocidade de absorção do solo e a constante de velocidade de eliminação do solo ( $k_s$  e  $k_e$  — cf. *infra*), é designado fator de bioacumulação cinético ( $BAF_K$ ).

**Fator de acumulação biota-solo** (BSAF) é o quociente entre a concentração do produto químico em estudo no interior ou à superfície do organismo sujeito ao ensaio, normalizada relativamente ao teor de lípidos, e a concentração do mesmo produto químico no solo, normalizada relativamente ao teor de carbono orgânico, em estado estacionário.  $C_a$  é então expressa em g por kg de lípidos do organismo e  $C_s$  em g por kg de teor orgânico do solo; as unidades em que se exprime o BSAF são kg de carbono orgânico por kg de lípidos.

**Patamar** ou **estado estacionário** é o equilíbrio entre os processos de absorção e de eliminação que ocorrem simultaneamente durante a fase de exposição. No gráfico do BAF em função do tempo, o estado estacionário é atingido quando a curva se torna uma linha paralela ao eixo do tempo e três cálculos sucessivos do BAF em amostras colhidas com intervalos de, pelo menos, dois dias não diferem mais de 20 % entre si, sem que haja diferenças significativas entre os três períodos de amostragem. No caso de produtos químicos de absorção lenta, são mais adequados intervalos de sete dias (49).

**Coefficiente de partição carbono orgânico-água** ( $K_{oc}$ ) é o quociente entre a concentração de um produto químico no interior ou à superfície da fração de carbono orgânico de um solo e a concentração do mesmo produto químico na água, em condições de equilíbrio.

**Coefficiente de partição octanol-água** ( $K_{ow}$ , por vezes também representado por  $P_{ow}$ ), é o quociente entre a solubilidade de um produto químico em n-octanol e a solubilidade do mesmo produto químico na água, em condições de equilíbrio. O logaritmo de  $K_{ow}$  ( $\log K_{ow}$ ) é utilizado como indicador do potencial de bioacumulação de produtos químicos em organismos aquáticos.

**Fase de absorção** ou **de exposição** é o período durante o qual os organismos sujeitos ao ensaio estão expostos ao produto químico em estudo.

**Constante de velocidade de absorção do solo** ( $k_s$ ) é o valor numérico que define o ritmo (ou taxa) de aumento da concentração do produto químico em estudo no interior ou à superfície do organismo sujeito ao ensaio, em resultado da fase de absorção de solo;  $k_s$  é expressa em g de solo por kg de verme por dia.

**Fase de eliminação** é o período, depois de os organismos sujeitos ao ensaio serem transferidos de um meio contaminado para um meio isento do produto químico em estudo, durante o qual é estudada a eliminação (ou perda líquida) do produto químico por esses organismos.

**Constante de velocidade de eliminação** ( $k_e$ ) é o valor numérico que define o ritmo (ou taxa) de redução da concentração do produto químico em estudo no interior ou à superfície do organismo sujeito ao ensaio, depois de o organismo sujeito ao ensaio ser transferido de um meio que contém o produto químico para um meio dele isento;  $k_e$  é expressa em  $\text{dia}^{-1}$ .

**Produto químico em estudo** é qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

## Apêndice 2

**Cálculo dos parâmetros de absorção e de eliminação**

O principal parâmetro final de um ensaio de bioacumulação é o fator de bioacumulação — BAF. O BAF pode ser calculado dividindo a concentração no organismo sujeito ao ensaio,  $C_a$ , pela concentração no solo,  $C_s$ , em estado estacionário. Se não se atingir o estado estacionário durante a fase de absorção, calcula-se o  $BAF_K$  a partir das constantes de velocidade, em vez do  $BAF_{ss}$ . Deve, porém, indicar-se se o BAF é ou não baseado nas concentrações em estado estacionário.

O meio habitual para obter o fator de bioacumulação cinético ( $BAF_K$ ), a constante de velocidade de absorção do solo ( $k_s$ ) e a constante de velocidade de eliminação ( $k_e$ ) são métodos informáticos de estimativa de parâmetros não lineares — por exemplo, com base nos modelos descritos na referência (68). Dado um conjunto de dados sequenciais de concentração em função do tempo e as equações de modelo:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad (\text{equação 1})$$

ou

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k_e(t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad (\text{equação 2})$$

em que

$C_a$  = concentração do produto químico nos vermes [g por kg de massa húmida ou seca]

$k_s$  = constante de velocidade de absorção nos tecidos [g de solo por kg de verme por dia]

$C_s$  = concentração do produto químico no solo [g por kg de massa húmida ou seca]

$k_e$  = constante de velocidade de eliminação [dia<sup>-1</sup>]

$t_c$  = tempo decorrido até ao final da fase de absorção,

esses programas informáticos calculam os valores de  $BAF_K$ ,  $k_s$  e  $k_e$ .

Se a concentração de fundo nos vermes não expostos — por exemplo, no dia 0 — diferir significativamente de zero (pode, por exemplo, ser o caso relativamente aos metais), essa concentração de fundo ( $C_{a,0}$ ) deve ser incluída nas equações, transformando-as em:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad (\text{equação 3})$$

e

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k_e(t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad (\text{equação 4})$$

Nos casos em que, durante a fase de absorção, se observa ao longo do tempo um decréscimo significativo da concentração do produto químico no solo, podem utilizar-se os seguintes modelos — p. ex., 67 e 79:

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \quad (\text{equação 5})$$

em que

$C_s$  = concentração do produto químico no solo [g por kg de massa húmida ou seca]

$k_0$  = constante de velocidade de degradação no solo [dia<sup>-1</sup>]

$C_0$  = concentração inicial do produto químico no solo [g por kg de massa húmida ou seca]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad (\text{equação 6})$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t c} * e^{-k(t-t_c)} \quad t > t_c \quad (\text{equação 7})$$

em que

$C_a$  = concentração do produto químico nos vermes [g por kg de massa húmida ou seca]

$k_s$  = constante de velocidade de absorção nos tecidos [g de solo por kg de verme por dia]

$k_0$  = constante de velocidade de degradação no solo [dia<sup>-1</sup>]

$k_e$  = constante de velocidade de eliminação [dia<sup>-1</sup>]

$t_c$  = tempo decorrido até ao final da fase de absorção.

Se durante a fase de absorção for atingido o estado estacionário (ou seja, se  $t = \infty$ ), a equação 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k} e^t) \quad 0 < t < t_c \quad (\text{equação 1})$$

pode ser reduzida a:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

ou

$$C_a/C_s = k_s/k_e = \text{BAF}_K \quad (\text{equação 8})$$

Então  $k_s/k_e \times C_s$  é uma aproximação à concentração do produto químico nos tecidos dos vermes em estado estacionário ( $C_{a,ss}$ ).

O fator de acumulação biota-solo (BSAF) pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{BSAF} = \text{BAF}_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \quad (\text{equação 9})$$

em que  $f_{oc}$  é a fração de carbono orgânico do solo e  $f_{lip}$  é a fração de lípidos dos vermes, ambas preferencialmente determinadas em amostras colhidas no âmbito do ensaio e baseadas, ambas, na massa seca ou na massa húmida.

As constantes cinéticas de eliminação podem ser modelizadas utilizando os dados da fase de eliminação e aplicando a equação de modelo *infra* e um método informático de estimativa de parâmetros não lineares. Se o gráfico dos dados em função do tempo indicar um decréscimo exponencial constante da concentração do produto químico nos animais, pode utilizar-se um modelo monocompartimental (equação 9) para descrever a eliminação ao longo do tempo.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad (\text{equação 10})$$

Os processos de eliminação revelam-se por vezes bifásicos, com rápido decréscimo de  $C_a$  durante as primeiras fases da eliminação e perda mais lenta do produto químico em estudo nas fases posteriores — p. ex., 27 e 68. As duas fases podem ser interpretadas admitindo que há dois compartimentos distintos no organismo, que eliminam a velocidades diferentes o produto químico em estudo. Nestes casos, deve consultar-se literatura específica — p. ex., 38, 39, 40 e 78.

Por meio das equações de modelo *supra*, os parâmetros cinéticos ( $k_s$  e  $k_e$ ) podem também ser calculados de uma só vez aplicando o modelo de cinética de primeira ordem simultaneamente a todos os dados da fase de absorção e da fase de eliminação. Para a descrição de um método que permita esse cálculo combinado das constantes de velocidade de absorção e de eliminação, consultar, por exemplo, as referências 41, 73 e 70.

$$C_a = \left[ \frac{K_s}{K_e} \cdot C_s (1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1) \right] + \left[ \frac{K_s}{K_e} \times C_s (e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2) \right] \quad (\text{equação 11})$$

*Nota:* Se os parâmetros de absorção e de eliminação forem estimados simultaneamente a partir dos dados combinados de absorção e de eliminação, o "m" que aparece na equação 11 é um descritor que permite ao programa informático associar os subtermos da equação aos conjuntos de dados da fase respetiva e efetuar corretamente os cálculos (m = 1 para a fase de absorção, m = 2 para a fase de eliminação).

Estas equações de modelo devem, porém, ser utilizadas com precaução, em especial se, durante o ensaio, ocorrerem alterações da biodisponibilidade ou da (bio)degradação do produto químico em estudo — p. ex., (79).

## Apêndice 3

## EXEMPLOS DE PROGRAMAÇÃO DE ENSAIOS DE BIOACUMULAÇÃO NO SOLO

**Ensaio em minhocas**

a) Fase de absorção, com oito datas de colheita de amostras para cálculo dos parâmetros cinéticos

Dia	Atividade
- 6	O solo preparado é condicionado durante 48 h;
- 4	A fração de solo é enriquecida com a solução do produto químico em estudo; deixa-se evaporar os solventes; misturam-se os componentes do solo; distribui-se o solo pelos recipientes de ensaio; estabelece-se o equilíbrio com as condições do ensaio durante quatro dias (três semanas no caso de solo enriquecido com metais);
- 3 a - 1	Os organismos que vão ser sujeitos ao ensaio são separados da cultura, para aclimação; os componentes do solo são preparados e humedecidos;
0	Mede-se a temperatura e o pH do solo; são retiradas amostras de solo dos recipientes enriquecidos e dos controlos do solvente, para determinar a concentração do produto químico em estudo; adiciona-se ração alimentar; as minhocas são pesadas e distribuídas aleatoriamente pelos recipientes de ensaio; separa-se subamostras suficientes de minhocas para determinar os valores analíticos de fundo, a massa húmida, a massa seca e o teor de lípidos; pesa-se todos os recipientes de ensaio, para verificar o teor de humidade do solo; verifica-se a alimentação de ar, se for utilizado um sistema de ensaio fechado;
1	Verifica-se a alimentação de ar e regista-se o comportamento das minhocas e a temperatura; colhe-se amostras do solo e das minhocas para determinar a concentração do produto químico em estudo;
2	O mesmo que no dia 1;
3	Verifica-se a alimentação de ar, o comportamento das minhocas e a temperatura;
4	O mesmo que no dia 1;
5 - 6	O mesmo que no dia 3;
7	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; repõe-se a água evaporada;
8 - 9	O mesmo que no dia 3;
10	O mesmo que no dia 1;
11 - 13	O mesmo que no dia 3;
14	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; repõe-se a água evaporada;
15 - 16	O mesmo que no dia 3;
17	O mesmo que no dia 1;
18 - 20	O mesmo que no dia 3;
21	O mesmo que no dia 1; mede-se a temperatura e o pH do solo; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; termina a fase de absorção; transfere-se as minhocas dos replicados expostos restantes para recipientes contendo solo limpo, com vista à fase de eliminação (sem purga do trato digestivo); colhe-se amostras de solo e de minhocas dos controlos do solvente.
	As atividades de pré-exposição (fase de estabelecimento do equilíbrio) devem ser programadas tendo em conta as propriedades do produto químico em estudo.
	As atividades descritas para o dia 3 devem ser executadas diariamente (pelo menos em dias úteis).



## b) Fase de eliminação

Dia	Atividade
- 6	Os componentes do solo são preparados e humedecidos; o solo preparado é condicionado durante 48 h;
- 4	Mistura-se os componentes do solo; distribui-se o solo pelos recipientes de ensaio; incuba-se nas condições de ensaio durante 4 dias;
0 (final da fase de absorção)	Mede-se a temperatura e o pH do solo; as minhocas são pesadas e distribuídas aleatoriamente pelos recipientes de ensaio; adiciona-se ração alimentar; transferem-se as minhocas dos replicados expostos restantes para recipientes contendo solo limpo; colhem-se amostras do solo e das minhocas quatro a seis horas mais tarde, para determinar a concentração do produto químico em estudo;
1	Verifica-se a alimentação de ar e regista-se o comportamento das minhocas e a temperatura; colhe-se amostras do solo e das minhocas para determinar a concentração do produto químico em estudo;
2	O mesmo que no dia 1;
3	Verificam-se a alimentação de ar, o comportamento das minhocas e a temperatura;
4	O mesmo que no dia 1;
5 - 6	O mesmo que no dia 3;
7	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; repõe-se a água evaporada;
8 - 9	O mesmo que no dia 3;
10	O mesmo que no dia 1;
11 - 13	O mesmo que no dia 3;
14	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio e compensando a água evaporada;
15 - 16	O mesmo que no dia 3;
17	O mesmo que no dia 1;
18 - 20	O mesmo que no dia 3;
21	O mesmo que no dia 1; mede-se a temperatura e o pH do solo; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; colhe-se amostras de solo e de minhocas dos controlos do solvente.
	Antes de se iniciar a fase de eliminação, o solo deve ser preparado do mesmo modo que antes de se iniciar a fase de absorção.
	As atividades descritas para o dia 3 devem ser executadas diariamente (pelo menos em dias úteis).

**Ensaio em vermes da família *Enchytraeidae***

## a) Fase de absorção, com oito datas de colheita de amostras, para cálculo dos parâmetros cinéticos

Dia	Atividade
- 6	O solo preparado é condicionado durante 48 h;
- 4	A fração de solo é enriquecida com a solução do produto químico em estudo; deixa-se evaporar os solventes; mistura-se os componentes do solo; distribui-se o solo pelos recipientes de ensaio; estabelece-se o equilíbrio com as condições do ensaio durante quatro dias (três semanas no caso de solo enriquecido com metais);

Dia	Atividade
- 3 a - 1	Os organismos que vão ser sujeitos ao ensaio são separados da cultura, para aclimação; prepara-se e humedece-se os componentes do solo;
0	Mede-se a temperatura e o pH do solo; colhe-se amostras de solo dos recipientes enriquecidos e dos controlos do solvente, para determinar a concentração do produto químico em estudo; adiciona-se ração alimentar ao solo; os vermes são pesados e distribuídos aleatoriamente pelos recipientes de ensaio; separa-se subamostras suficientes de vermes para determinar os valores analíticos de fundo, a massa húmida, a massa seca e o teor de lípidos; pesa-se todos os recipientes de ensaio, para verificar o teor de humidade do solo; verifica-se a alimentação de ar, se for utilizado um sistema de ensaio fechado;
1	Verifica-se a alimentação de ar e regista-se o comportamento dos vermes e a temperatura; colhe-se amostras do solo e dos vermes, para determinar a concentração do produto químico em estudo;
2	O mesmo que no dia 1;
3	Verifica-se a alimentação de ar, o comportamento dos vermes e a temperatura;
4	O mesmo que no dia 1;
5 - 6	O mesmo que no dia 3;
7	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar ao solo; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes; repõe-se a água evaporada;
9	O mesmo que no dia 1;
10	O mesmo que no dia 3;
11	O mesmo que no dia 1;
12 - 13	O mesmo que no dia 3;
14	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar ao solo; mede-se a temperatura e o pH do solo; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; termina a fase de absorção; transfere-se os vermes dos replicados expostos restantes para recipientes contendo solo limpo, com vista à fase de eliminação (sem purga do trato digestivo); colhe-se amostras de solo e de vermes dos controlos do solvente.
	As atividades de pré-exposição (fase de estabelecimento do equilíbrio) devem ser programadas tendo em conta as propriedades do produto químico em estudo.
	As atividades descritas para o dia 3 devem ser executadas diariamente (pelo menos em dias úteis).

## Apêndice 4

**Solo artificial — recomendações de preparação e armazenagem**

Dado que podem não estar disponíveis ao longo de todo o ano solos naturais de uma determinada origem e que a presença de organismos indígenas e de micropoluentes pode influenciar o ensaio, recomenda-se para este um substrato artificial, o solo artificial a que se refere o capítulo C.8 deste anexo — *Toxicidade em relação às minhocas* (48). Várias espécies cobaias podem sobreviver, desenvolver-se e reproduzir-se neste solo, garantindo-se uma estandardização máxima e a comparabilidade intralaboratorial e interlaboratorial das condições de ensaio e de cultura.

## Componentes do solo

Turfa:	10 %	Turfa de <i>Sphagnum</i> , em conformidade com o <i>Test Guideline 207</i> da OCDE (48);
Areia quartzítica:	70 %	Areia quartzítica industrial (seca ao ar); granulometria: mais de 50 % das partículas devem situar-se no intervalo 50-200 µm, mas todas devem ser ≤ 2 mm;
Argila caulínica:	20 %	Teor de caulinite ≥ 30 %;
Carbonato de cálcio:	≤ 1 %	CaCO <sub>3</sub> , pulverizado, quimicamente puro.

Opcionalmente, pode reduzir-se o teor de carbono orgânico do solo artificial — por exemplo, baixando o teor de turfa para 4-5 % do solo seco e subindo correspondentemente o teor de areia. Com esta redução do teor de carbono orgânico, podem diminuir-se as possibilidades de adsorção do produto químico em estudo ao solo (carbono orgânico) e pode favorecer-se a disponibilização do produto aos vermes (74). Foi demonstrado que as espécies *Enchytraeus albidus* e *Eisenia fetida* podem cumprir os critérios de validade relativos à reprodução quando sujeitas a ensaio em solos naturais com teor de carbono orgânico inferior — p. ex., 2,7 % (33)(61). A experiência adquirida revela que o mesmo se pode também conseguir em solo artificial com 5 % de turfa.

**Preparação**

Os componentes secos do solo são misturados cuidadosamente (por exemplo, num misturador laboratorial grande). Esta operação deve ser executada cerca de uma semana antes do início do ensaio. Depois de misturados, os componentes secos devem ser humedecidos com água desionizada pelo menos 48 horas antes da aplicação do produto químico em estudo, a fim de equilibrar ou estabilizar a acidez. Para determinar o pH, utiliza-se uma mistura 1:5 de solo com uma solução 1 M de KCl. Se o valor do pH não estiver dentro do intervalo requerido (6,0 ± 0,5), adiciona-se ao solo uma quantidade suficiente de CaCO<sub>3</sub> ou prepara-se um novo lote de solo.

A capacidade máxima de retenção de água do solo artificial é determinada de acordo com a norma ISO 11268-2 (35). Pelo menos dois dias antes do início do ensaio, o solo artificial seco é humedecido, adicionando água desionizada ou reconstituída até se obter aproximadamente metade do teor final de água. O teor final de água deve situar-se entre 40 % e 60 % da capacidade máxima de retenção de água. No início do ensaio, o solo previamente humedecido é dividido em tantos lotes quantas as concentrações e os controlos utilizados no ensaio, e o teor de humidade é ajustado para 40 % a 60 % da capacidade máxima de retenção de água com a solução do produto químico em estudo e/ou adicionando água desionizada ou reconstituída. O teor de humidade é determinado no início e no final do ensaio (a 105 °C). Deve ser o teor ótimo para a espécie sujeita ao ensaio (o teor de humidade pode também ser verificado do seguinte modo: espremendo o solo delicadamente na mão, devem aparecer pequenas gotas de água entre os dedos).

**Armazenagem**

Os componentes secos do solo artificial podem ser armazenados à temperatura ambiente do laboratório até à sua utilização. O solo preparado e previamente humedecido pode ser armazenado em local fresco até três dias antes do seu enriquecimento; deve minimizar-se a evaporação de água. O solo enriquecido com o produto químico em estudo deve ser utilizado de imediato, a menos que haja indicações de que o solo em questão pode ser armazenado sem afetar a toxicidade e a biodisponibilidade do produto químico em causa. Podem então ser armazenadas amostras do solo enriquecido, respeitando as condições recomendadas para o produto químico em estudo, até à realização das análises.

## Apêndice 5

**Espécies de oligoquetas terrestres recomendadas para ensaios de bioacumulação no solo****Minhocas**

A espécie recomendada para os ensaios é a *Eisenia fetida* (Savigny 1826), pertencente à família *Lumbricidae* e dividida desde 1972 em duas subespécies — *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* (10). Segundo Jaenike (36), trata-se de duas espécies separadas. A *Eisenia fetida* é facilmente identificável pelas listras amarelas brilhantes intersegmentais, ao passo que a *Eisenia andrei* tem cor vermelha escura uniforme. Originárias provavelmente da região do Mar Negro, estão hoje distribuídas por todo o mundo, sobretudo em habitats antropogenicamente modificados, como as montureiras de compostagem. Ambas podem ser utilizadas para ensaios ecotoxicológicos e de bioacumulação.

A *Eisenia fetida* e a *E. andrei* são comercializadas, por exemplo, como isco para pesca. Em comparação com outros vermes da família *Lumbricidae*, têm um ciclo de vida curto, atingindo a maturidade por volta dos 2 ou 3 meses (à temperatura ambiente do laboratório). A temperatura ótima para elas é de 20 a 24 °C. Preferem substratos relativamente húmidos, com pH próximo da neutralidade e teor elevado de matéria orgânica. Como estas espécies têm sido amplamente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos standardizados desde há uns 25 anos, a sua criação em cultura está bem estabelecida (48)(77).

Ambas as espécies podem ser cultivadas numa ampla gama de resíduos de origem animal. O meio de cultura recomendado pela ISO é uma mistura 50:50 de esterco de cavalo ou de bovino com turfa (35). O meio deve ter um pH de 6 a 7 (regulado com carbonato de cálcio) e baixa condutividade iónica (menos de 6 mS/cm ou menos de 0,5 % de concentração salina) e não deve estar excessivamente contaminado com amoníaco ou urina. Pode também ser utilizado um solo comercial para jardinagem, sem aditivos, solo artificial correspondente à norma da OCDE (48) ou uma mistura 50:50 de ambos. O substrato deve estar húmido, mas não encharcado. São adequadas caixas de cultura de 10 a 50 litros.

Para obter minhocas de idade e massa normalizadas, é melhor iniciar a cultura com casulos de ovos. Por conseguinte, junta-se minhocas adultas a uma caixa de cultura com substrato fresco, para produzir casulos. A experiência demonstra que uma densidade populacional próxima dos 100 vermes adultos por kg de substrato (massa húmida) conduz a boas taxas de reprodução. Ao cabo de 28 dias, retira-se as minhocas adultas. Os vermes provenientes da eclosão dos ovos são utilizados nos ensaios quando atingem a maturidade, ou seja, a partir dos dois meses de idade, mas não ultrapassando os 12 meses.

Os vermes destas duas espécies podem ser considerados saudáveis se se movimentarem através do substrato, não tentarem abandoná-lo e se reproduzirem continuamente. Movimentos muito lentos ou um posterior de cor amarelada (no caso da *Eisenia fetida*) indicam exaustão do substrato. Nesse caso, recomenda-se substrato fresco e/ou um número mais reduzido de animais por caixa.

**Referências selecionadas adicionais**

Gerard B.M. (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 *Lumbricidae*. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O. (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtschaft. 7: 1-81.

Römbke J., Egeler P., Füll C. (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S. (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. *Oikos* 28: 49-55.

Satchell J.E. (1955). Some aspects of earthworm ecology. *Soil Zoology* (Kevan): 180-201.

Sims R.W. e Gerard B.M. (1985). A synopsis of the earthworms. *Linnean Soc. London* 31: 1-171.

Tomlin A.D. (1984). The earthworm bait market in North America. In: *Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture*. Satchell J.E. (ed.), Chapman & Hall, Londres. 331-338 pp.

**Vermes da família *Enchytraeidae***

A espécie recomendada para os ensaios é a *Enchytraeus albidus* (Henle 1837), uma das maiores da família *Enchytraeidae* de anelídeos oligoquetas (pode atingir 15 mm) e com distribuição mundial — p. ex., 8. A *Enchytraeus albidus* encontra-se em habitats marinhos, limosos ou terrestres, sobretudo em matéria orgânica em decomposição (algas, produtos de compostagem) e raramente em prados (42). Esta ampla tolerância ecológica e algumas variações morfológicas indicam que poderão haver diversas raças ou subespécies.

A *Enchytraeus albidus* é comercializada como alimento para peixes. Deve verificar-se se a cultura está contaminada por outras espécies, normalmente menores (60). Se houver contaminação, lavam-se todos os vermes numa placa de Petri e selecionam-se em seguida, por meio de um estereomicroscópio, grandes espécimes adultos de *Enchytraeus albidus*, para

iniciar uma nova cultura. Rejeitam-se todos os restantes indivíduos. O ciclo de vida da espécie é curto, pois a maturidade é atingida entre os 33 dias (a 18 °C) e os 74 dias (a 12 °C). Somente culturas mantidas no laboratório sem problemas durante pelo menos cinco semanas (uma geração) devem ser utilizadas nos ensaios.

Há outras espécies do género *Enchytraeus* igualmente adequadas, com destaque para a *Enchytraeus luxuriosus*, que tem o seu habitat verdadeiramente no solo e que foi descrita pela primeira vez na referência (65). Se forem utilizadas outras espécies de *Enchytraeus*, importa identificá-las claramente e justificar a seleção.

A *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992) é uma espécie pertencente ao mesmo grupo da *Enchytraeus luxuriosus*. Não está provado que ocorra no campo, tendo sido descrita apenas em culturas de minhocas e montureiras de compostagem (Römbke 2003). Por conseguinte, desconhece-se as suas exigências ecológicas originais. Contudo, estudos laboratoriais recentes em vários solos naturais confirmaram que esta espécie tem uma tolerância ampla em relação a propriedades do solo como o pH e a textura (Jänsch *et al.* 2005). Em anos recentes, foi frequentemente utilizada em estudos ecotoxicológicos, dada a simplicidade da sua criação e da sua sujeição a ensaio (p. ex., Kuperman *et al.* 2003). É, porém, pequena (3-12 mm, com 7 mm em média — Westheide e Müller 1996), o que dificulta a sua manipulação, a comparar com a *Enchytraeus albidus*. Se esta espécie for utilizada em vez da *Enchytraeus albidus*, o recipiente de ensaio pode ser menor. Por outro lado, deve ter-se em conta que esta espécie se reproduz muito rapidamente, tendo um período de geração inferior a 20 dias a  $20 \pm 2$  °C (Achazi *et al.* 1999) ou mesmo mais curto se a temperatura for mais elevada.

Os vermes da espécie *Enchytraeus albidus* (bem como de outras espécies congéneres) podem ser criados em grandes caixas de plástico (por exemplo, de  $30 \times 60 \times 10$  cm ou de  $20 \times 12 \times 8$  cm, as dimensões adequadas para a cultura de vermes de pequeno tamanho), cheias com uma mistura de solo artificial e de solo para jardinagem, não contaminado e sem aditivos. O material de compostagem deve ser evitado, pois pode conter produtos químicos tóxicos, como metais pesados. Antes da utilização, deve remover-se qualquer fauna do solo de cultura, mediante três ciclos de ultracongelamento. Pode também utilizar-se solo artificial puro, mas a taxa de reprodução poderá ser mais lenta, em comparação com a obtida com substratos mistos. O substrato deve ter um pH de  $6,0 \pm 0,5$ . A cultura é mantida numa incubadora à temperatura de  $15 \pm 2$  °C, sem luz. Devem evitar-se sempre temperaturas superiores a 23 °C. O solo, artificial ou natural, deve estar húmido, mas não encharcado. Pressionando o solo suavemente com a mão, devem aparecer apenas gotículas de água. Devem evitar-se sempre condições anóxicas (por exemplo, se se utilizar uma tampa, esta deve ter orifícios em número suficiente para uma boa renovação do ar). Deve arejar-se o solo da cultura, mexendo-o cuidadosamente uma vez por semana.

Os vermes devem ser alimentados pelo menos uma vez por semana, *ad libitum*, com flocos de aveia, que se colocam numa cavidade da superfície e se cobrem em seguida com solo. Se no recipiente restar alimento da última ministração, a quantidade distribuída deve ser ajustada em conformidade. Se se tiverem desenvolvido fungos, o alimento restante deve ser substituído por uma nova porção de flocos. A fim de estimular a reprodução, a aveia pode ser complementada, de duas em duas semanas, com proteínas em pó enriquecidas com vitaminas (à venda no comércio). Ao cabo de três meses, os animais são transferidos para uma cultura ou um substrato de reprodução, recentemente preparados. Os flocos de aveia, que têm de ser guardados em recipientes herméticos, devem ser tratados em autoclave ou aquecidos antes da sua ministração, para evitar infeções por ácaros — p. ex., *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina, ou *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina. Após a desinfeção, os flocos são moídos, para poderem ser facilmente espalhados na superfície do solo. Uma outra fonte possível de alimento é o fermento de padaria ou a comida para peixes TetraMin®.

Em geral, as condições de cultura são satisfatórias se os vermes não tentarem abandonar o substrato, se movimentarem rapidamente através do solo, exibirem uma superfície externa brilhante, sem partículas de solo pegadas, e tiverem uma coloração mais ou menos esbranquiçada e se forem visíveis vermes de diferentes idades. Na verdade, os vermes podem ser considerados saudáveis se se reproduzirem continuamente.

#### Referências selecionadas adicionais

Achazi R.K., Fröhlich E., Henneken M., Pilz C. (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (*Enchytraeidae*, *Oligochaeta*). *Newsletter on Enchytraeidae* 6: 117-126.

Jänsch S., Amorim M.J.B., Römbke J. (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. *Environ. Reviews* 13: 51-83.

Kuperman R.G., Checkai R.T., Simini M., Phillips C.T., Kolakowski J.E., Kurnas C.W., Sunahara G.I. (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Enchytraeidae*) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. *Pedobiologia* 47: 651-656.

Römbke J. (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. *Pedobiologia* 47: 607-616.

Westheide W. e Graefe U. (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (*Oligochaeta*, *Annelida*). *J. Nat. Hist.* 26: 479-488.

Westheide W. e Müller M.C. (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. *Hydrobiologia* 334: 263-267.»