

II

(Atos não legislativos)

REGULAMENTOS

REGULAMENTO (UE) 2017/735 DA COMISSÃO

de 14 de fevereiro de 2017

que altera, tendo em vista a adaptação ao progresso técnico, o anexo do 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 ⁽¹⁾, nomeadamente o artigo 13.º, n.º 2,

Considerando o seguinte:

- (1) O Regulamento (CE) n.º 440/2008 da Comissão ⁽²⁾ estabelece os métodos de ensaio a aplicar para os fins do Regulamento (CE) n.º 1907/2006 com vista à determinação das propriedades físico-químicas, da toxicidade e da ecotoxicidade dos produtos químicos.
- (2) A fim de ter em conta o progresso técnico e de reduzir o número de animais utilizados para fins experimentais, em conformidade com a Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho ⁽³⁾, é necessário atualizar o Regulamento (CE) n.º 440/2008 de modo a nele incluir determinados métodos de ensaio, atualizados e novos, adotados recentemente pela Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos (OCDE). Consultaram-se as partes interessadas sobre o presente projeto.
- (3) A presente adaptação ao progresso técnico compreende um método novo para determinação de uma propriedade físico-química, cinco métodos novos e um atualizado para avaliações de ecotoxicidade, dois métodos atualizados para avaliação do comportamento e do destino final no ambiente e quatro métodos novos e sete atualizados para determinação de efeitos na saúde humana, num total de vinte métodos de ensaio.
- (4) A OCDE reexamina regularmente as suas orientações de ensaio (*Test Guidelines*) para identificar as que se tenham tornado obsoletas do ponto de vista científico. A presente adaptação ao progresso técnico elimina seis métodos de ensaio cujas orientações da OCDE foram canceladas.

⁽¹⁾ JO L 396 de 30.12.2006, p. 1.

⁽²⁾ Regulamento (CE) n.º 440/2008 da Comissão, de 30 de maio de 2008, que estabelece métodos de ensaio nos termos do Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH) (JO L 142 de 31.5.2008, p. 1).

⁽³⁾ 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).

- (5) O Regulamento (CE) n.º 440/2008 deve, portanto, ser alterado em conformidade.
- (6) 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,

ADOTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1.º

O anexo do Regulamento (CE) n.º 440/2008 é alterado em conformidade com o anexo do presente regulamento.

Artigo 2.º

O presente regulamento entra em vigor no vigésimo 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 14 de fevereiro de 2017.

Pela Comissão

O Presidente

Jean-Claude JUNKER

ANEXO

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

1) Na parte A, é aditado o seguinte capítulo:

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

INTRODUÇÃO

Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline 112* (1981) da OCDE.

Pré-requisitos

- Método analítico adequado
- Solubilidade em água

Dados para orientação

- Fórmula estrutural
- Condutividade elétrica (método condutimétrico)

Condições de admissibilidade

- Todos os métodos de ensaio podem ser executados com substâncias puras ou comerciais. Devem ser tidos em conta os possíveis efeitos de impurezas nos resultados.
- O método por titulação não é adequado para substâncias de baixa solubilidade (ver infra, «soluções de ensaio»).
- O método espectrofotométrico só é aplicável a substâncias cujas formas dissociada e não dissociada têm espectros de absorção UV/VIS apreciavelmente diferentes. Pode também ser adequado para substâncias com baixa solubilidade e para substâncias dissociativas que não sejam ácidas nem básicas (p. ex., formação de complexos).
- Nos casos que obedecem à equação de Onsager, pode utilizar-se um método condutimétrico, mesmo em concentrações relativamente baixas e em casos nos quais não exista um equilíbrio ácido/base.

Documentos normalizados

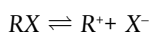
O presente método baseia-se nos métodos indicados nas referências incluídas na respetiva secção e no *Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification* da EPA, de 18 de agosto de 1978.

MÉTODO — INTRODUÇÃO, FINALIDADE, ÂMBITO, PERTINÊNCIA, APLICAÇÃO E LIMITES DO ENSAIO

A dissociação de uma substância na água é importante para avaliar o seu impacto no ambiente. Determina a forma da substância, que, por sua vez, determina o seu comportamento e o seu transporte. Pode afetar a absorção da substância nos solos e nos sedimentos, bem como nas células biológicas.

Definições e unidades

Dissociação é a divisão reversível em duas ou mais espécies químicas, que podem ser iónicas. O processo, em termos gerais, é expresso pela equação



A constante de equilíbrio que rege a reação, expressa em função da concentração, é dada por

$$K = \frac{[R^+][X^-]}{[RX]}$$

Por exemplo, no caso particular em que R é o hidrogénio (substância ácida), a constante é

$$K_a = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

ou

$$pK_a = pH - \log \frac{[X^-]}{[HX]}$$

Substâncias de referência

Quando se investiga uma substância nova, não é necessário utilizar em todos os casos as substâncias de referência que se seguem. Referem-se, principalmente, para executar com regularidade a calibração do método, bem como para possibilitar a comparação dos resultados se se aplicar outro método.

	pK _a (1)	Temp. em °C
p-Nitrofenol	7,15	251
Ácido benzoico	4,12	20
p-Cloroanilina	3,93	20

(1) Não se dispõe de nenhum valor a 20 °C, mas pode presumir-se que a variabilidade dos resultados de medição é superior à dependência previsível da temperatura

Seria útil dispor de uma substância com vários pKs, conforme se referirá na descrição do princípio do método. Uma substância desse tipo pode ser, por exemplo:

Ácido cítrico	pK _a (8)	Temp. em °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Princípio do método de ensaio

Em termos gerais, o processo descrito depende apenas ligeiramente da temperatura, na gama de temperaturas relevantes do ponto de vista ambiental. A determinação da constante de dissociação exige a medição das concentrações das formas dissociada e não dissociada do produto químico. A constante pode ser determinada com base na estequiometria da reação de dissociação indicada em «Definições e unidades». No caso específico descrito no presente método de ensaio, a substância comporta-se como ácido ou como base, sendo a determinação feita, de forma mais prática, pela determinação das concentrações relativas das formas ionizada e não ionizada da substância e do pH da solução. A relação entre estes termos é dada pela equação que define o pK_a, na secção «Definições e unidades». Algumas substâncias apresentam várias constantes de dissociação, para as quais se podem estabelecer equações semelhantes. Alguns dos métodos a seguir descritos são também adequados para processos de dissociação que não envolvam ácidos nem bases.

CrITÉRIOS de qualidade

Repetibilidade

A constante de dissociação deve ser reproduzível com uma aproximação a ± 0,1 unidades logarítmicas (no mínimo, três determinações).

DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO DE ENSAIO

Podem adotar-se duas abordagens básicas para a determinação do pK_a . Uma delas consiste na titulação de uma determinada quantidade de substância com um padrão ácido ou básico, consoante o caso; a outra consiste em determinar a concentração relativa das formas ionizada e não ionizada e a sua dependência do pH.

Preparações

Os métodos baseados nos referidos princípios compreendem processos de titulação, espectrofotométricos e condutimétricos.

Soluções utilizadas no ensaio

Nos métodos de titulação e condutimétrico, o produto químico deve ser dissolvido em água destilada. No caso da espectrofotometria e de outros métodos, utilizam-se soluções-tampão. A concentração da substância em estudo não pode exceder 0,01 M ou metade da concentração de saturação (prevalecendo o menor destes valores), devendo utilizar-se uma substância com a maior pureza possível para completar as soluções. Se a substância for moderadamente solúvel, pode ser dissolvida numa pequena quantidade de solvente miscível em água antes de ser adicionada nas concentrações atrás indicadas.

Deve averiguar-se a presença de emulsões nas soluções por recurso a um feixe de filtração, em especial se se utilizar um cossolvente para reforçar a solubilidade. Se se utilizarem soluções-tampão, a concentração do tampão não pode exceder 0,05 M.

Condições de realização do ensaio

Temperatura

A temperatura deve ser mantida num intervalo máximo de ± 1 °C. A determinação deve ser efetuada, de preferência, à temperatura de 20 °C.

Caso se preveja que os resultados dependam da temperatura, a determinação deve ser efetuada a, pelo menos, duas outras temperaturas de ensaio. Nestas condições, os intervalos de temperatura devem ser de 10 °C e a temperatura deve ser mantida a $\pm 0,1$ °C.

Análises

O método será determinado pela natureza da substância que se pretende ensaiar. Deve ser suficientemente sensível para permitir a determinação das diferentes espécies em cada concentração de ensaio.

Realização do ensaio

Método de titulação

A solução de ensaio é titulada com a solução-padrão de ácido ou de base, consoante o caso, medindo-se o pH após cada adição de titulante. Devem efetuar-se, pelo menos, 10 adições antes de ser atingido o ponto de equivalência. Se o equilíbrio for atingido com rapidez suficiente, pode utilizar-se um potenciómetro registador. Neste método, tanto a quantidade total como a concentração da substância têm de ser conhecidas com rigor. Devem ser tomadas precauções para evitar a interferência de dióxido de carbono. Os ensaios de referência (p. ex., referências (1), (2), (3) e (4)) contêm pormenores sobre o procedimento, as precauções a tomar e os cálculos.

Método espectrofotométrico

Determina-se o comprimento de onda ao qual as formas ionizada e não ionizada da substância têm coeficientes de extinção consideravelmente diferentes. Obtém-se o espectro de absorção no UV/VIS de soluções de concentração constante, em função do pH, para substâncias essencialmente não ionizadas e totalmente ionizadas, a vários pH intermédios. Para tal, pode proceder-se à adição de porções de ácido ou base concentrados a um volume relativamente grande de uma solução da substância num tampão multicomponentes, a um pH inicialmente alto ou baixo (ref. 5), ou à adição de volumes iguais de uma solução de reserva da substância (p. ex., em água ou metanol) a volumes constantes de diversas soluções-tampão que abranjam o intervalo de pH pretendido. A partir dos valores de pH e de absorvância no comprimento de onda selecionado, calcula-se um número suficiente de valores de pK_a utilizando dados a, pelo menos, cinco pH, se a substância for ionizada a, pelo menos, 10 % e a menos de 90 %. A referência (1) apresenta dados experimentais complementares e o método de cálculo.

Método condutimétrico

Utilizando uma célula de constante conhecida (baixa), mede-se a condutividade de uma solução aproximadamente 0,1 M da substância em água condutora. Medem-se também as condutividades de uma série de diluições rigorosas da solução. Reduz-se a concentração para metade em cada ensaio, devendo a série abranger, pelo menos, uma ordem de grandeza de concentração. Determina-se a condutividade-limite a uma diluição infinita, realizando um ensaio similar com o sal sódico e extrapolando. O grau de dissociação pode ser calculado a partir da condutividade de cada solução, utilizando a equação de Onsager; a constante de dissociação pode ser calculada por recurso à lei da diluição de Ostwald, de acordo com a equação $K = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$, em que C é a concentração, em moles por litro, e α a fração dissociada. Devem tomar-se precauções para evitar a interferência de CO_2 . Os textos normalizados e as referências (1), (6) e (7) apresentam dados experimentais complementares, assim como o método de cálculo.

RESULTADOS E RELATÓRIO

Tratamento dos resultados

Método de titulação

Calcula-se o pK_a para 10 pontos medidos na curva de titulação. Calculam-se a média e o desvio-padrão dos valores de pK_a . Juntamente com a apresentação na forma de quadro, deve fornecer-se uma representação gráfica do pH em função do volume da base-padrão ou do ácido-padrão.

Métodos espectrofotométricos

Tabulam-se a absorvância e o pH relativamente a cada espectro. Calculam-se, pelo menos, cinco valores de pK_a a partir dos dados espectrais intermédios, calculando-se também a média e o desvio-padrão dos resultados.

Método condutimétrico

A condutividade equivalente, Λ , é calculada para cada concentração de ácido e para cada concentração de uma mistura de um equivalente de ácido e 0,98 equivalentes de hidróxido de sódio isento de carbonatos. Utiliza-se ácido em excesso a fim de evitar um excesso de iões OH^- devido à ocorrência de hidrólise. Representa-se graficamente $1/\Lambda$ em função de O_2C ; o valor Λ_0 do sal pode ser determinado por extrapolação à concentração zero.

O valor Λ_0 do ácido pode ser calculado utilizando os valores referidos na bibliografia para H^+ e Na^+ . O pK_a pode ser calculado com base nas equações $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_0$ e $K_a = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$, para cada concentração. Podem obter-se valores mais rigorosos de K_a aplicando correções relativas à mobilidade e à atividade. Devem calcular-se a média e o desvio-padrão dos valores de pK_a .

Relatório de ensaio

Devem apresentar-se todos os dados em bruto e os valores calculados de pK_a , juntamente com o método de cálculo (de preferência em forma de quadro, como sugerido na ref. 1), assim como os parâmetros estatísticos acima descritos. No respeitante aos métodos por titulação, devem fornecer-se pormenores sobre a normalização dos titulantes.

No respeitante ao método espectrofotométrico, devem apresentar-se todos os espectros. No respeitante ao método condutimétrico, deve especificar-se o modo de determinação da constante da célula. Devem também fornecer-se informações sobre a técnica utilizada, os métodos analíticos e a natureza dos eventuais tampões utilizados.

Devem ainda comunicar-se as temperaturas de ensaio.

REFERÊNCIAS

- 1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases*, Wiley, Inc., New York, 1962.
- 2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, *Env. Sci. Tech.* 3, II, pp. 1186-1188 (1969).

- 3) ASTM D 1293 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
 - 4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.
 - 5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. *Chem. Ind. (London)* 281, (março de 1973).
 - 6) ASTM D 1125 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
 - 7) Standard Method 205 — APHA/AWWA/NPCF [ver (4) acima].
 - 8) *Handbook of Chemistry and Physics*, 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).»
- 2) Na parte B, o capítulo B.5 é substituído pelo seguinte texto:

«B.5 IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR AGUDAS

INTRODUÇÃO

Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline 405* (2012) da OCDE. Para que espelhem o estado da ciência, os *Test Guidelines* da OCDE para o ensaio de produtos químicos são revistos periodicamente. Em revisões anteriores do *Test Guideline 405*, foi dada especial atenção aos possíveis melhoramentos resultantes da avaliação de toda a informação já existente sobre o produto químico em estudo, de modo a evitar ensaios desnecessários em animais de laboratório e assim atender à problemática do bem-estar animal. O *Test Guideline 405* (adotado em 1981 e atualizado em 1987, 2002 e 2012) inclui a recomendação de se efetuar uma análise de ponderação da suficiência da prova (1) dos dados relevantes já existentes antes de se realizar o ensaio *in vivo* descrito para a irritação/corrosão aguda. No caso de não se encontrarem disponíveis dados suficientes, recomenda-se a obtenção desses dados através da aplicação de ensaios sequenciais (2) (3). A estratégia de ensaio recomendada inclui a realização de ensaios *in vitro* validados e reconhecidos, como se descreve no suplemento do presente método. As orientações da Agência Europeia dos Produtos Químicos (ECHA) compreendem igualmente uma estratégia de ensaio integrada (21) para os efeitos do Regulamento (CE) n.º 1907/2006, relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH) ⁽¹⁾. Apenas se deve recorrer a ensaios em animais se tal vier a ser considerado necessário depois de examinados os métodos alternativos disponíveis e de aplicados os tidos como adequados. À data da atualização do presente método de ensaio, há casos em que continua a ser necessário recorrer a este método ou em que determinados quadros legislativos o exigem.

A atualização mais recente, sem incidências nos conceitos básicos e na estrutura das orientações de ensaio, centrou-se na utilização de analgésicos e de anestésicos. O ICCVAM ⁽²⁾ e um painel científico internacional independente de pares avaliadores examinaram a utilidade e as limitações da utilização rotineira de anestésicos tópicos, de analgésicos sistémicos e de parâmetros eticamente aceitáveis em ensaios de irritação ocular *in vivo* realizados por razões de segurança. Concluiu-se do exame efetuado que o recurso a anestésicos tópicos e a analgésicos sistémicos pode eliminar praticamente ou mesmo eliminar na totalidade a dor e o sofrimento causados aos animais, sem prejudicar os resultados dos ensaios, tendo sido recomendada a utilização sistemática dessas substâncias. O presente método tem em conta o referido exame. Nos ensaios de irritação e corrosão ocular aguda *in vivo* devem ser utilizados rotineiramente anestésicos tópicos, analgésicos sistémicos e parâmetros eticamente aceitáveis. As exceções a este princípio têm de ser justificadas. Os aperfeiçoamentos incorporados no presente método reduzirão substancialmente ou eliminarão mesmo a dor e o sofrimento dos animais na maior parte das situações ensaiadas, nos casos em que continue a ser necessário realizar ensaios oculares *in vivo* por razões de segurança.

Uma gestão preventiva e equilibrada da dor passa: (i) pela administração rotineira de um anestésico tópico (proparacaína ou tetracaína, por exemplo) e de um analgésico sistémico (por exemplo a buprenorfina) antes da aplicação do produto químico em estudo; (ii) por um programa de analgesia sistémica de rotina após a aplicação do produto químico em estudo (através da buprenorfina e do meloxicam, por exemplo); (iii) por um programa de observação, monitorização e registo de sinais clínicos de dor e/ou sofrimento nos animais; (iv) por um programa de observação, monitorização e registo da natureza, intensidade e evolução das lesões oculares. Apresentam-se mais elementos nos procedimentos atualizados a seguir descritos. Para evitar interferências no estudo, não devem ser administrados anestésicos ou analgésicos tópicos depois de administrado o produto químico em estudo. Os analgésicos anti-inflamatórios (por exemplo o meloxicam) não devem ser aplicados por via tópica e as doses utilizadas por via sistémica não devem interferir nos efeitos oculares.

Estabelecem-se definições no apêndice 1 do método de ensaio.

⁽¹⁾ 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 (JO L 304 de 22.11.2007, p. 1).

⁽²⁾ *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (comité de coordenação interagências na validação de métodos alternativos, dos E.U.A.).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Tendo em vista o melhor interesse científico e o bem-estar animal, não se deve encarar a realização de ensaios *in vivo* enquanto não tiverem sido avaliados, por meio de uma análise de ponderação da suficiência da prova, todos os dados disponíveis relevantes para os potenciais efeitos corrosivos/irritantes do produto químico ao nível ocular. Os dados compreendem elementos indiciadores de estudos já realizados no ser humano e/ou em animais de laboratório, provas de efeitos corrosivos/irritantes de uma ou mais substâncias estruturalmente afins ou de misturas dessas substâncias, dados reveladores de elevada acidez ou alcalinidade do produto químico (4) (5) e resultados de ensaios *in vitro* ou *ex vivo* de corrosão da pele e de corrosão/irritação ocular validados e reconhecidos (6) (13) (14) (15) (16) (17). Estes estudos podem ter sido realizados antes de uma análise de ponderação da suficiência da prova ou tê-lo sido no seguimento dessa análise.

No caso de alguns produtos químicos, a referida análise pode revelar a necessidade de estudos *in vivo* do potencial de irritação/corrosão ocular do produto químico. Nesses casos, antes de se ponderar a realização de um ensaio ocular *in vivo*, deve efetuar-se, preferencialmente, um estudo *in vitro* e/ou *in vivo* dos efeitos de corrosão da pele do produto químico, a avaliar de acordo com a estratégia de ensaio sequencial descrita no método de ensaio B.4 (7) ou com a estratégia de ensaio integrada descrita nas orientações da Agência Europeia dos Produtos Químicos (21).

O presente método compreende um suplemento descritivo de uma estratégia de ensaio sequencial que contempla a realização de ensaios validados de corrosão/irritação ocular *in vitro* ou *ex vivo*. A mesma estratégia é contemplada nas orientações da ECHA, para efeitos do Regulamento REACH (21). Recomenda-se a aplicação dessa estratégia de ensaio sequencial antes da realização de ensaios *in vivo*. No caso dos produtos químicos novos, recomenda-se o recurso a uma metodologia de ensaio por etapas para obter dados científicos fiáveis sobre os efeitos corrosivos/irritantes do produto químico. No caso dos produtos químicos já existentes, mas para os quais não se disponha de dados suficientes sobre corrosão/irritação da pele e corrosão/irritação ocular, pode recorrer-se à referida estratégia para obter os dados em falta. Caso se opte por uma estratégia ou um protocolo de ensaio diferente ou se decida não aplicar uma metodologia de ensaio por etapas, será necessário justificá-lo.

PRINCÍPIO DO ENSAIO *IN VIVO*

Após a administração de um analgésico sistémico e a indução da anestesia tópica adequada, aplica-se uma dose única do produto químico em estudo num dos olhos do animal utilizado no ensaio, servindo o outro olho de amostra de controlo. Avalia-se o grau de irritação/corrosão ocular pontuando as lesões da conjuntiva, da córnea e da íris a intervalos determinados. Para possibilitar uma avaliação completa dos efeitos, também se descrevem os outros efeitos oculares e as perturbações sistémicas. A duração do estudo deve ser suficiente para avaliar a reversibilidade ou irreversibilidade dos efeitos.

Os animais que, em qualquer estágio do ensaio, apresentem sinais de dor e/ou sofrimento acentuados ou lesões que excedam os níveis máximos eticamente aceitáveis descritos neste método (ver o ponto 26) devem ser eutanasiados, procedendo-se à avaliação do produto químico em conformidade. Os critérios por que se deve reger a decisão de eutanasiar animais moribundos e animais em grande sofrimento constam de um documento de orientações da OCDE (8).

PREPARAÇÃO PARA O ENSAIO *IN VIVO*

Escolha da espécie

O coelho albino é o animal de laboratório mais adequado, devendo recorrer-se a animais adultos jovens e saudáveis. Se forem utilizadas outras estirpes ou espécies será necessário justificá-lo.

Preparação dos animais

24 horas antes de lhe dar início, examinam-se ambos os olhos de cada animal provisoriamente selecionado para o ensaio. Não devem ser utilizados animais que apresentem irritação ocular, defeitos oculares ou lesões da córnea.

Condições de alojamento e de alimentação

Os animais devem ser alojados individualmente. A temperatura do biotério para o coelho deve ser de 20 °C ($\pm$ 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 alternância de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A intensidade luminosa não deve ser excessiva. Para a alimentação, podem ser usadas dietas convencionais de laboratório, com acesso ilimitado a água potável.

PROTOCOLO DE ENSAIO

Utilização de anestésicos tópicos e de analgésicos sistémicos

Para evitar ou minimizar a dor e o sofrimento nos ensaios oculares realizados por razões de segurança, recomendam-se os procedimentos a seguir descritos. Em alternativa, pode proceder-se de outro modo que comprovadamente permita evitar ou aliviar a dor e o sofrimento com eficácia idêntica ou superior à destes procedimentos.

- Para gerar um nível terapêutico de analgesia sistémica, administram-se, por injeção subcutânea, 0,01 mg de buprenorfina por quilograma, sessenta minutos antes da aplicação do produto químico em estudo. Não há indicações disso nem é previsível que a administração sistémica de buprenorfina e outros analgésicos opiáceos similares influencie as reações oculares (12).
- Cinco minutos antes da aplicação do produto químico em estudo, aplicam-se a cada olho uma ou duas gotas de um anestésico tópico ocular (por exemplo cloridrato de proparacaína a 0,5 % ou cloridrato de tetracaína a 0,5 %). Para evitar eventuais interferências no estudo, recomendam-se anestésicos tópicos sem conservantes. Serve de amostra de controlo o olho de cada animal que não recebe o produto químico em estudo, mas que é anestesiado por via tópica. Se for previsível que cause dor e sofrimento acentuados, o produto químico em estudo não será normalmente ensaiado *in vivo*. Todavia, em caso de dúvida ou se for necessário realizar o ensaio, deve ponderar-se a realização de aplicações adicionais do anestésico tópico a intervalos de cinco minutos, antes da aplicação do produto químico em estudo. Alerta-se, porém, para o facto de que aplicações múltiplas de anestésicos tópicos podem aumentar ligeiramente a gravidade das lesões induzidas pela aplicação do produto químico em estudo e/ou o tempo de reversão das mesmas.
- Para gerar um nível terapêutico contínuo de analgesia sistémica, injetam-se por via subcutânea 0,01 mg de buprenorfina por quilograma e 0,5 mg de meloxicam por quilograma, oito horas após a aplicação do produto químico em estudo. Embora os dados disponíveis não apontem para nenhum efeito anti-inflamatório do meloxicam nos olhos quando administrado diariamente por via subcutânea, este analgésico não deve ser administrado antes de transcorridas 8 horas sobre a aplicação do produto químico, para evitar qualquer interferência com o estudo (12).
- Após a primeira injeção 8 horas depois de aplicado o produto químico em estudo, injetam-se por via subcutânea 0,01 mg de buprenorfina por quilograma, de doze em doze horas, em associação com 0,5 mg de meloxicam por quilograma, de 24 em 24 horas, até ao desaparecimento das lesões oculares e de qualquer sinal clínico de dor ou sofrimento. Para diminuir a frequência da administração de analgésicos, pode ponderar-se o recurso a preparações analgésicas de libertação prolongada.
- Se a analgesia preventiva e a anestesia tópica se revelarem inadequadas, deve proceder-se a uma analgesia de emergência imediatamente após a aplicação do produto químico em estudo. Se um animal evidenciar sinais de dor ou sofrimento durante o estudo, em vez da aplicação subcutânea de 0,01 mg de buprenorfina por quilograma de doze em doze horas, deve ser-lhe imediatamente ministrada, por via subcutânea, uma dose de emergência de 0,03 mg de buprenorfina por quilograma, a qual, se necessário, pode ser repetida, com intervalos não inferiores a 8 horas. Em associação com a dose de emergência de buprenorfina, mas só depois de transcorridas 8 horas sobre a aplicação do produto químico em estudo, administram-se, por via subcutânea, 0,5 mg de meloxicam por quilograma, de 24 em 24 horas.

Aplicação do produto químico em estudo

Deposita-se o produto químico em estudo no saco conjuntival de um dos olhos de cada animal, depois de cuidadosamente afastada do globo ocular a pálpebra inferior. Em seguida, juntam-se cuidadosamente as pálpebras durante cerca de um segundo, para evitar perdas. O outro olho, no qual não é aplicado o produto químico em estudo, serve de amostra de controlo.

Irrigação

Os olhos dos animais utilizados no ensaio não devem ser lavados durante, pelo menos, as 24 horas seguintes à instilação do produto químico em estudo, exceto no caso dos sólidos (ver o ponto 18) e se surgir imediatamente alguma manifestação de corrosão ou de irritação. Passadas 24 horas, pode efetuar-se uma lavagem, se se considerar adequado.

Não se recomenda a utilização de um grupo-satélite de animais para investigar a influência da lavagem, a menos que razões científicas o justifiquem. Se for necessário um grupo-satélite de animais, este deve ser constituído por dois coelhos. As condições de lavagem devem ser cuidadosamente documentadas; por exemplo: data e hora da lavagem; composição e temperatura da solução de lavagem; duração, volume e velocidade de aplicação.

Nível de dosagem

1) Ensaio de líquidos

No ensaio de líquidos utiliza-se uma dose de 0,1 ml. Não devem ser utilizados nebulizadores de bomba para instilar diretamente o produto químico no olho. O líquido deve ser nebulizado e recolhido num recipiente antes de se instilarem 0,1 ml no olho.

2) Ensaio de sólidos

No ensaio de sólidos, massas ou produtos químicos em partículas, a quantidade a utilizar deve ser de 0,1 ml ou uma massa não superior a 100 mg. O produto químico em estudo deve ser reduzido a um pó fino. O volume da matéria sólida deve ser medido após compactação ligeira; por exemplo: batendo várias vezes, com cuidado, no recipiente que a contém. Se, aquando da primeira observação, 1 hora após a aplicação do produto químico sólido em estudo, este não tiver sido removido, pelos mecanismos fisiológicos, do olho do animal ensaiado, pode lavar-se o olho com soro fisiológico ou água destilada.

3) Ensaio de aerossóis

Recomenda-se que o volume a instilar seja previamente extraído do nebulizador de bomba ou pulverizador de aerossol, antes de o aplicar no olho. A única exceção é para produtos químicos que se apresentem em recipientes de aerossol pressurizados, os quais não podem ser previamente extraídos por se vaporizarem. Nesses casos, deve manter-se o olho aberto e administrar-se o produto químico por meio de um jato único com a duração aproximada de um segundo, mantendo o recipiente à distância de 10 cm, diretamente à frente do olho. A distância pode variar em função da pressão do jato e da composição do mesmo. Devem ser tomadas precauções adequadas para que a pressão do jato não lesione o olho. Em determinados casos, pode ser necessário avaliar o potencial de lesão «mecânica» do olho pela força exercida pelo jato.

Pode obter-se uma estimativa da dose de um aerossol através da simulação da aplicação no ensaio da seguinte forma: pulveriza-se o produto químico para um papel de pesagem através de uma abertura do tamanho de um olho de coelho, colocada diretamente à frente do papel. O aumento de peso do papel corresponde aproximadamente à quantidade pulverizada no olho. No caso dos produtos químicos voláteis, pode estimar-se a dose pesando o recipiente que contém o produto químico em estudo antes e depois de este dele ser retirado.

Ensaio inicial (ensaio *in vivo* de irritação/corrosão ocular num único animal)

Recomenda-se vivamente que o ensaio *in vivo* seja realizado uma primeira vez num único animal (ver o suplemento «Estratégia de ensaio sequencial para irritação e corrosão oculares» a este método de ensaio). A passagem ou não a um ensaio de confirmação noutro animal depende da intensidade e do grau de reversibilidade observados no primeiro.

Se os resultados deste primeiro ensaio, realizado conforme descrito, indicarem que o produto químico é corrosivo ou irritante severo para o olho, deve pôr-se termo aos ensaios de irritação ocular.

Ensaio de confirmação (ensaio *in vivo* de irritação ocular noutros animais)

Se, no ensaio inicial, não for observada corrosão nem irritação severa, é necessário confirmar a reação de irritação ou a reação negativa noutro animal ou noutros dois animais. Se, no ensaio inicial, for observada irritação, recomenda-se que o ensaio de confirmação seja realizado num animal de cada vez, não expondo os dois animais simultaneamente. Se for observada corrosão ou irritação severa no segundo animal, não se continua o ensaio. Se os resultados observados no segundo animal permitirem estabelecer uma classificação de perigosidade, também não será necessário prosseguir o ensaio.

Período de observação

O período de observação deve ser suficiente para uma avaliação completa da intensidade e da reversibilidade dos efeitos observados. No entanto, as experiências devem ser imediatamente interrompidas se algum animal apresentar sinais de dor intensa ou de grande sofrimento (8). Para determinar a reversibilidade dos efeitos, normalmente os animais devem ser examinados durante 21 dias após a administração do produto químico em estudo. Caso se observe reversibilidade antes de terminado o período de 21 dias, interrompem-se imediatamente as experiências.

Exames clínicos e pontuação das reações oculares

Uma hora após a aplicação do produto químico em estudo e, subsequentemente, pelo menos uma vez por dia, observam-se atentamente os olhos para verificar a presença ou ausência de lesões oculares. Nos três primeiros dias, os animais devem ser examinados várias vezes por dia, para que as eventuais decisões de pôr termo aos ensaios possam ser tomadas atempadamente. Os animais utilizados no ensaio devem ser sujeitos a exames de rotina durante o estudo, pelo menos duas vezes por dia, respeitando um intervalo de, pelo menos, seis horas entre os exames (que, ainda assim, pode ser reduzido em caso de necessidade), com vista à deteção de sinais clínicos de dor e/ou sofrimento (por exemplo, tocam repetidamente com as patas no olho, ou coçam-no repetidamente, pestanejam demasiado ou lacrimejam muito) (9) (10) (11). Estes exames são necessários para: (i) detetar adequadamente qualquer sinal de dor ou de sofrimento dos animais, a fim de poder tomar decisões fundamentadas sobre a necessidade de aumentar ou não a dose de analgésicos; (ii) detetar qualquer indício de que os níveis máximos eticamente aceitáveis tenham sido excedidos, a fim de poder tomar decisões fundamentadas sobre a conveniência de eutanasiar os animais, em ambos os casos atempadamente. Para facilitar a deteção e a medição das lesões oculares e determinar se os níveis máximos eticamente aceitáveis já foram excedidos, utiliza-se normalmente a coloração pela fluoresceína e, se necessário (por exemplo para determinar a profundidade da lesão em caso de ulceração da córnea), um biomicroscópio equipado com lâmpada de fenda. Para referência e para manter um registo permanente da extensão das lesões oculares, podem tirar-se fotografias digitais das lesões observadas. Os animais só devem ser mantidos em ensaio durante o tempo necessário para obter informações definitivas. Os que evidenciem dor intensa ou grande sofrimento devem ser eutanasiados sem demora, procedendo-se à avaliação do produto químico em conformidade.

Devem ser eutanasiados os animais que, depois da instilação, apresentem as seguintes lesões oculares (ver no quadro 1 a descrição da graduação das lesões): perfuração da córnea ou ulceração significativa da córnea associada a estafiloma; presença de sangue na câmara anterior do olho; opacidade da córnea de grau 4; ausência de reflexo à luz (resposta da íris de grau 2), persistente durante 72 horas; ulceração da membrana conjuntival; necrose das conjuntivas ou da membrana nictitante; ou descamação. A razão disto é que normalmente estas lesões são irreversíveis. Recomenda-se ainda que as lesões oculares a seguir indicadas sejam consideradas motivo eticamente suficiente para pôr termo ao estudo antes de concluído o período de observação programado de 21 dias (trata-se de lesões indiciadoras de sintomatologia de efeitos corrosivos ou de irritação severa e de lesões previsivelmente não reversíveis na totalidade até ao final do período de observação de 21 dias): lesões muito profundas (por exemplo ulcerações da córnea que vão além das camadas superficiais do estroma), destruição do limbo superior a 50 % (evidenciada pelo embranquecimento do tecido conjuntival) e infeção ocular severa (corrimento purulento). A associação de vascularização da superfície da córnea (pano) a uma superfície corada pela fluoresceína que não vai diminuindo dia a dia e/ou à inexistência de reepitelização 5 dias após a aplicação do produto químico em estudo também pode ser ponderada como critério potencialmente útil a ter em conta nas decisões clínicas de pôr ou não termo ao estudo antecipadamente. Todavia, cada uma destas observações não é, por si só, suficiente para justificar o termo antecipado do estudo. Se forem detetados efeitos oculares severos, deve solicitar-se, ao veterinário assistente, a outro veterinário especializado em animais de laboratório ou a pessoal formado na identificação de lesões clínicas, que proceda a um exame clínico para determinar se a associação dos ditos efeitos constitui motivo suficiente para antecipar o termo do estudo. Determinam-se e registam-se os graus de reação ocular (das conjuntivas, da córnea e da íris) transcorridas 1, 24, 48 e 72 horas sobre a aplicação do produto químico em estudo (quadro 1). Os animais nos quais não se desenvolvam lesões oculares nos três dias subsequentes à instilação podem ser retirados do estudo. Os que não apresentem lesões severas devem permanecer sob observação até ao desaparecimento das lesões ou durante 21 dias, após o que se põe termo ao estudo. Como mínimo, os exames de avaliação de lesões e de apreciação da reversibilidade ou irreversibilidade destas devem ser efetuados, e os seus resultados registados, transcorridos 1 hora, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias sobre a aplicação do produto químico em estudo. Se necessário, podem realizar-se exames mais frequentes para determinar se um determinado animal deve ser eutanasiado, com base em critérios éticos, ou retirado do estudo, por evidenciar resultados negativos.

Ao realizar um exame, registam-se os graus das lesões oculares (quadro 1). Quaisquer outras lesões oculares (por exemplo: pano da córnea, coloração ou alterações da câmara anterior) ou perturbações sistémicas devem igualmente ser mencionadas no relatório.

O exame das reações pode ser facilitado pela utilização de uma lupa binocular, de uma lâmpada de fenda portátil, de um biomicroscópio ou de outro instrumento apropriado. Uma vez registadas as observações às 24 horas, pode prosseguir-se o exame dos olhos com o auxílio de fluoresceína.

A graduação das reações oculares é necessariamente subjetiva. Numa perspetiva de harmonização da graduação das reações oculares e em benefício dos laboratórios de ensaio e das pessoas envolvidas na realização dos exames e na interpretação das observações, o pessoal que realiza os exames deve receber formação adequada sobre o sistema de graduação utilizado.

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação dos resultados

Os graus de irritação ocular devem ser avaliados conjuntamente com a natureza, a intensidade e a reversibilidade ou irreversibilidade das lesões. As pontuações individuais não representam um padrão absoluto das propriedades irritantes do produto químico em estudo, pois são também avaliados outros efeitos do mesmo. Pelo contrário, as pontuações individuais devem ser encaradas como valores de referência e só têm significado quando enquadradas numa descrição e numa avaliação completas do conjunto das observações.

Relatório do ensaio

Elementos a constar do relatório do ensaio:

Justificação do ensaio in vivo: análise de ponderação da suficiência da prova dos dados de ensaios anteriores, incluindo os resultados da estratégia de ensaio sequencial:

- descrição dos dados relevantes disponíveis provenientes de ensaios anteriores;
- dados obtidos em cada etapa da estratégia de ensaio;
- descrição dos ensaios *in vitro* realizados, incluindo detalhes sobre o protocolo seguido e os resultados obtidos com os produtos químicos em estudo/de referência;
- descrição do estudo *in vivo* de irritação/corrosão dérmica realizado, incluindo os resultados obtidos;
- modo como a análise de ponderação da suficiência da prova redundou na realização do estudo *in vivo*.

Produto químico em estudo:

- dados de identificação (por exemplo: denominação química e, se conhecido, número CAS, grau de pureza, impurezas conhecidas, proveniência, número de lote);
- natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo: pH, volatilidade, solubilidade, estabilidade, reatividade com água);
- no caso das misturas, identificação dos componentes, incluindo os dados identificativos das substâncias componentes (por exemplo: denominações químicas e, se conhecidos, os números CAS) e as respetivas concentrações;
- dose aplicada.

Excipiente:

- identificação, concentração (se pertinente), volume utilizado;
- justificação do excipiente escolhido.

Animais ensaiados:

- espécie/estirpe utilizada, justificação da eventual utilização de outros animais que não coelhos albinos;
- idade de cada animal no início do estudo;
- número de animais de cada sexo no grupo de ensaio e nos grupos de controlo necessários;
- peso de cada animal no início e no final do ensaio;
- origem, condições de alojamento, dieta etc.

Anestésicos e analgésicos:

- doses anestésicas tópicas e analgésicas sistémicas administradas e respetiva cronologia;
- em caso de utilização de anestésicos locais, identificação, grau de pureza, tipo e interação potencial com o produto químico em estudo.

Resultados:

- descrição do método utilizado para pontuar a irritação em cada observação (por exemplo: lâmpada de fenda portátil, biomicroscópio, fluoresceína);
- quadro dos dados de reação irritante/corrosiva correspondentes a cada animal e a cada observação, até o animal ser retirado do ensaio;
- descrição pormenorizada do grau e da natureza da irritação ou corrosão observada;
- descrição de quaisquer outras lesões oculares observadas (por exemplo: vascularização, formação de pano da córnea, aderências, coloração);
- descrição de efeitos adversos não-oculares locais e sistémicos, registo de sinais clínicos de dor ou sofrimento, fotografias digitais e observações histopatológicas, se for caso disso.

*Discussão dos resultados.***Interpretação dos resultados**

A extrapolação, para seres humanos, de resultados de estudos de irritação ocular em animais de laboratório tem algumas limitações de validade. Em muitos casos, o coelho albino é mais sensível do que o ser humano a produtos químicos irritantes ou corrosivos oculares.

A interpretação dos dados deve ser cuidadosa, para excluir qualquer irritação resultante de infeções secundárias.

REFERÊNCIAS

- 1) Barratt, M.D., *et al.* (1995). The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. *ATLA*, 23, 410-429.
- 2) de Silva, O., *et al.* (1997). Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. *Food Chem. Toxicol.*, 35, 159-164.
- 3) Worth, A.P., Fentem, J.H. (1999). A general approach for evaluating stepwise testing strategies. *ATLA*, 27, 161-177.
- 4) Young, J.R., *et al.* (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19-26.
- 5) Neun, D.J. (1993). Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.*, 12, 227-231.
- 6) Fentem, J.H., *et al.* (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in vitro*, 12, 483-524.
- 7) Capítulo B.4 deste anexo, «Toxicidade aguda: irritação/corrosão dérmica»
- 8) OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment, No. 19 (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- 9) Wright, E.M., Marcella, K.L., Woodson, J.F (1985). Animal pain: evaluation and control. *Lab Animal*, maio/junho, 20-36.
- 10) National Research Council (NRC) (2008). Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals. Washington, DC, The National Academies Press.
- 11) National Research Council (NRC) (2009). Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. Washington, DC, The National Academies Press.

- 12) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing. NIH Publication No. 10-7514. Research Triangle Park, NC, USA, National Institute of Environmental Health Sciences

(<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest-TMER.htm>).
- 13) Capítulo B.40 deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*: ensaio da resistência elétrica transcutânea (RET)»
- 14) Capítulo B.40.A deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*: ensaio em modelos de pele humana»
- 15) OCDE (2006). *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OCDE, Paris.
- 16) Capítulo B.47 deste anexo, «Método de ensaio de opacidade e permeabilidade da córnea em bovinos para identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves»
- 17) Capítulo B.48 deste anexo, «Método de ensaio em olhos de frango isolados para identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves»
- 18) U.S. EPA (2003). Label Review Manual, 3.^a edição, EPA737-B-96-001. Washington, DC, Agência de Protecção do Ambiente dos E.U.A.
- 19) ONU (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Quarta edição, revista. Nova Iorque e Genebra, Publicações das Nações Unidas.
- 20) 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).
- 21) ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance

(http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf).

Quadro 1

Graduação de lesões oculares

Córnea	Grau
Opacidade: grau de densidade (as medições devem ser efetuadas na zona mais densa) (*)	
Sem ulceração nem opacidade	0
Zonas de opacidade dispersas ou difusas (excluídas as perdas ligeiras do lustro normal); detalhes da íris claramente visíveis	1
Zona translúcida claramente discernível; detalhes da íris ligeiramente obscurecidos	2
Zona nacarada; nenhum detalhe da íris visível; tamanho da pupila dificilmente discernível	3

Córnea	Grau
Córnea opaca; íris não discernível através da opacidade	4
Máximo possível: 4	
Íris	
Normal	0
Rugas acentuadamente mais profundas, congestão, tumefação, hiperemia pericorneal moderada ou injeção da conjuntiva; íris reativa à luz (uma reação lenta é considerada efeito positivo)	1
Hemorragia, destruição acentuada ou ausência de reação à luz	2
Máximo possível: 2	
Conjuntivas	
Vermelhidão (nas conjuntivas palpebral e bulbar, não na córnea nem na íris)	
Normal	0
Alguns vasos sanguíneos com hiperemia (injetados)	1
Cor carmesim difusa; vasos individuais não claramente discerníveis	2
Cor vermelho-carne difusa	3
Máximo possível: 3	
Quemose	
Tumefação (das pálpebras e/ou das membranas nictantes)	
Normal	0
Tumefação ligeiramente superior ao normal	1
Tumefação evidente, com eversão parcial das pálpebras	2
Tumefação, com as pálpebras semicerradas	3
Tumefação, com as pálpebras mais do que semicerradas	4
Máximo possível: 4	

(*) Anotar a zona de opacidade da córnea.

Apêndice

DEFINIÇÕES

Reserva ácida/alcalina: No caso das preparações ácidas, é a quantidade de hidróxido de sódio, em gramas, necessária por 100 g de preparação para obter um determinado pH. No caso das preparações alcalinas, é a quantidade de hidróxido de sódio, em gramas, equivalente à massa, em gramas, de ácido sulfúrico necessária por 100 g de preparação para obter um determinado pH (Young *et al.*, 1988).

Produto químico: Substância ou mistura.

Não-irritante: Substância não classificada nas categorias I, II ou III de irritantes oculares da EPA, nem nas categorias 1, 2, 2A ou 2B de irritantes oculares do sistema GHS da ONU, nem nas categorias 1 ou 2 da UE (17) (18) (19).

Corrosivo ocular: a) Produto químico que provoca lesões irreversíveis nos tecidos do olho; b) Produto químico classificado na categoria 1 de irritantes oculares do sistema GHS da ONU, na categoria I de irritantes oculares da EPA ou na categoria 1 da UE (17) (18) (19).

Irritante ocular: a) Produto químico que provoca alterações reversíveis no olho; b) Produto químico classificado nas categorias II ou III de irritantes oculares da EPA, nas categorias 2, 2A ou 2B de irritantes oculares do sistema GHS da ONU ou na categoria 2 da UE (17) (18) (19).

Irritante ocular severo: a) Produto químico que provoca lesões nos tecidos do olho que não desaparecem nos 21 dias após a aplicação ou que provoca uma degradação grave da visão; b) Produto químico classificado na categoria 1 de irritantes oculares do sistema GHS da ONU, na categoria I de irritantes oculares da EPA ou na categoria 1 da UE (17) (18) (19).

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

Abordagem sequencial por etapas: Estratégia sequencial de ensaio em que, seguindo uma ordem estabelecida, se avalia toda a informação disponível sobre o produto químico em estudo, por um processo baseado na ponderação da suficiência da prova em cada etapa, com o objetivo de determinar se há informação suficiente para uma decisão de classificação de perigosidade antes de passar à etapa seguinte. Se a informação existente possibilitar a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, não serão necessários mais ensaios. Se a informação existente não possibilitar a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, procede-se a uma série de ensaios sequenciais em animais até ser possível atribuir uma classificação inequívoca.

Ponderação da suficiência da prova: Processo que consiste em ponderar os pontos fortes e os pontos fracos de um conjunto de informações para tirar conclusões que podem não ser extraíveis dos dados individuais.

SUPLEMENTO AO MÉTODO DE ENSAIO B.5 ⁽¹⁾

ESTRATÉGIA DE ENSAIO SEQUENCIAL PARA IRRITAÇÃO E CORROSÃO OCULARES

Aspetos gerais

Tendo em vista o melhor interesse científico e o bem-estar animal, importa evitar a utilização desnecessária de animais e minimizar os ensaios que neles possam causar reações severas. Antes de se ponderar a realização de ensaios *in vivo*, devem ser analisadas todas as informações disponíveis sobre o produto químico com importância para as potencialidades de irritação/corrosão ocular do mesmo. Pode dar-se o caso de existirem já dados suficientes para classificar o produto químico em estudo em termos do seu potencial irritante ou corrosivo ocular, sem necessidade de realizar ensaios em animais de laboratório. O recurso a uma análise de ponderação da suficiência da prova e a uma estratégia de ensaio sequencial minimizará, portanto, a necessidade de ensaios *in vivo*, especialmente no caso dos produtos químicos suscetíveis de produzir reações severas.

Recomenda-se o recurso a uma análise de ponderação da suficiência da prova para avaliar a informação existente sobre irritação e corrosão oculares causadas por produtos químicos e para determinar se a caracterização do potencial de irritação e corrosão oculares exige a realização de estudos adicionais, que não estudos oculares *in vivo*. No caso de serem necessários estudos adicionais, recomenda-se uma estratégia de ensaio sequencial para obter os dados experimentais relevantes. No caso das substâncias que nunca tenham sido ensaiadas, também deve ser utilizada a dita estratégia sequencial para obter os dados necessários à avaliação da capacidade irritante e da corrosividade oculares da substância. A estratégia de ensaio inicial descrita neste suplemento foi elaborada por um grupo de trabalho da OCDE (1). Foi subsequentemente confirmada e ampliada no sistema harmonizado e integrado de classificação dos perigos das substâncias químicas para a saúde humana e para o ambiente, aprovado na 28.^a sessão conjunta do comité dos produtos químicos e do grupo de trabalho «Produtos Químicos» realizada em novembro de 1998 (2), e atualizada por um grupo de peritos da OCDE em 2011.

Apesar de não fazer parte do método de ensaio B.5, esta estratégia de ensaio expressa a metodologia recomendada para a determinação de propriedades de irritação/corrosão ocular. Esta metodologia representa, não só as melhores práticas, mas também uma referência ética para os ensaios *in vivo* de irritação/corrosão ocular. O método de ensaio dá orientações para a realização de ensaios *in vivo* e resume os fatores a ter em conta antes de a ponderar. A estratégia de ensaio sequencial compreende uma metodologia de ponderação da suficiência da prova, para avaliar os dados já existentes sobre as propriedades de irritação/corrosão oculares de produtos químicos, e uma abordagem sequencial por etapas, para obter os dados necessários sobre os produtos químicos que careçam de estudos adicionais ou que nunca tenham sido estudados. A estratégia inclui, primeiro, a realização de ensaios *in vitro* ou *ex vivo* validados e reconhecidos e, em seguida, a realização de estudos segundo o método de ensaio B.4, adaptados às circunstâncias específicas (3) (4).

Descrição da estratégia de ensaio por etapas

Antes de realizar ensaios integrados na estratégia de ensaio sequencial (ver o quadro infra), deve avaliar-se, com base nas informações disponíveis, se são ou não necessários ensaios oculares *in vivo*. Embora possam obter-se informações significativas avaliando isoladamente determinados parâmetros (por exemplo um pH extremo), importa examinar todas as informações existentes. Para uma decisão baseada na ponderação da suficiência da prova, devem ser avaliados todos os dados relevantes sobre os efeitos do produto químico, bem como dos análogos estruturais deste, e deve fundamentar-se a decisão tomada. Devem ser privilegiados os dados já existentes sobre os efeitos do produto químico em pessoas e animais, seguindo-se os resultados de ensaios *in vitro* ou *ex vivo*. Sempre que possível, devem evitar-se estudos *in vivo* de produtos químicos corrosivos. Fatores considerados na estratégia de ensaio:

Avaliação dos dados já existentes sobre efeitos no ser humano e/ou em animais e/ou dos dados obtidos por métodos *in vitro* validados reconhecidos internacionalmente (1.^a etapa)

⁽¹⁾ Para pôr em prática uma estratégia de ensaio integrada relativamente à irritação ocular no âmbito do Regulamento REACH, ver igualmente o capítulo R.7a, «Endpoint specific guidance», do documento *Guidance on information requirements and chemical safety assessment* da Agência Europeia dos Produtos Químicos (ECHA): http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

Uma vez que fornecem informações diretamente relacionadas com os efeitos nos olhos, os primeiros dados a ter em conta devem ser os já existentes sobre efeitos no ser humano — por exemplo, de estudos clínicos e de medicina no trabalho e de relatórios de casos clínicos — e/ou dados de estudos realizados em animais por meio de ensaios oculares e/ou dados *in vitro* obtidos por métodos validados reconhecidos internacionalmente, relativos a irritação/corrosão ocular. Em seguida, devem ser avaliados os dados disponíveis de estudos de investigação da irritação/corrosão dérmica no ser humano e/ou em animais e/ou de estudos *in vitro* de corrosão da pele, obtidos por métodos validados reconhecidos internacionalmente. Não devem instilar-se nos olhos de animais produtos químicos que, reconhecidamente, tenham efeitos corrosivos ou causem irritação severa nos olhos nem produtos químicos com efeitos corrosivos ou de irritação severa na pele, os quais se deve considerar que também têm efeitos corrosivos ou de irritação severa nos olhos. Também não se devem ensaiar em estudos oculares *in vivo* produtos químicos relativamente aos quais estudos oculares realizados anteriormente comprovem suficientemente não terem efeitos corrosivos nem irritantes nos olhos.

Análise de relações estrutura-atividade (REA) (2.ª etapa)

Devem ser tidos em conta os resultados disponíveis de ensaios de produtos químicos estruturalmente afins. Se houver dados suficientes, indicativos de irritação/corrosão oculares no ser humano e/ou em animais, sobre produtos químicos estruturalmente afins ou misturas dos mesmos, pode presumir-se que o produto químico em estudo gerará as mesmas reações. Nestes casos, pode não ser necessário ensaiar o produto químico. Dados negativos obtidos em estudos de produtos químicos estruturalmente afins ou de misturas dos mesmos não constituem prova suficiente da inexistência de efeitos corrosivos/irritantes do produto químico sujeito à estratégia de ensaio sequencial. As metodologias baseadas em relações estrutura-atividade a que se recorra para identificar possíveis efeitos corrosivos e irritantes na pele e nos olhos devem estar validadas e ser reconhecidas.

Propriedades físico-químicas e reatividade química (3.ª etapa)

Os produtos químicos com pH extremo ($\leq 2,0$ ou $\geq 11,5$) podem ter efeitos locais fortes. Se a identificação do carácter corrosivo ou irritante do produto químico ao nível ocular tiver por base um pH extremo, pode também ter-se em conta a reserva ácida/alcalina (poder de tamponamento) do produto químico em causa (5) (6) (7). Se o poder de tamponamento indicar que o produto químico pode não ser corrosivo para os olhos (produtos químicos com pH extremo, mas reserva ácida/alcalina baixa), devem ser realizados ensaios adicionais para o confirmar, de preferência recorrendo a ensaios *in vitro* ou *ex vivo* validados e reconhecidos (ver o ponto 10).

Consideração de outras informações existentes (4.ª etapa)

Nesta etapa, devem ser avaliadas todas as informações disponíveis sobre toxicidade sistémica por via dérmica. Deve também considerar-se a toxicidade dérmica aguda do produto químico em estudo. Se tiver sido demonstrado que o produto químico em estudo é muito tóxico por via dérmica, pode não ser necessário realizar ensaios oculares do mesmo. Apesar de não haver necessariamente relação entre toxicidade dérmica aguda e irritação/corrosão ocular, pode considerar-se que um agente muito tóxico por via dérmica também será muito tóxico quando instilado nos olhos. Dados deste tipo também podem ser examinados entre a 2.ª e a 3.ª etapas.

Avaliação da corrosividade dérmica do produto químico, se também necessário por exigências normativas (5.ª etapa)

Começa por se avaliar se o produto químico corrói a pele ou causa efeitos de irritação severa na pele pelo método de ensaio B.4 (4) e tendo em conta o suplemento apenso (8), preconizando-se o recurso a métodos de ensaio *in vitro* de corrosão da pele validados e reconhecidos internacionalmente (9) (10) (11). Se, comprovadamente, tiver efeitos corrosivos ou de irritação severa na pele, pode também considerar-se que o produto químico é corrosivo para os olhos ou gera irritação severa nos olhos, não sendo necessários ensaios complementares. Se o produto químico não corroer a pele nem gerar irritação severa na pele, deve efetuar-se um ensaio ocular *in vitro* ou *ex vivo*.

Resultados de ensaios *in vitro* ou *ex vivo* (6.ª etapa)

Não é necessário ensaiar em animais produtos químicos que se tenham revelado corrosivos ou geradores de irritação severa em ensaios *in vitro* ou *ex vivo* (12) (13) validados e reconhecidos internacionalmente para avaliar especificamente a corrosão/irritação ocular. Pode considerar-se que esses produtos químicos terão efeitos igualmente severos *in vivo*. Se não se dispuser de ensaios *in vitro/ex vivo* validados e reconhecidos, passa-se diretamente da 5.ª para a 7.ª etapas.

Ensaaios *in vivo* no coelho (7.^a e 8.^a etapas)

O ensaio ocular *in vivo* deve começar por um ensaio inicial num único animal. Se os resultados desse ensaio indicarem que o produto químico provoca irritação severa nos olhos ou os corrói, deve pôr-se termo ao ensaio. Se o ensaio não revelar nenhum efeito corrosivo nem de irritação severa, deve efetuar-se um ensaio de confirmação noutros dois animais. Consoante os resultados do ensaio de confirmação, poderão ou não ser necessários ensaios complementares. [Ver o método de ensaio B.5.]

ESTRATÉGIA DE ENSAIO E AVALIAÇÃO DE IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR

	Atividade	Observação	Conclusão
1	Dados já existentes sobre efeitos no ser humano e/ou em animais, e/ou dados <i>in vitro</i> obtidos por métodos validados reconhecidos internacionalmente, revelam efeitos oculares Dados já existentes sobre efeitos no ser humano e/ou em animais, e/ou dados <i>in vitro</i> obtidos por métodos validados reconhecidos internacionalmente, revelam efeitos corrosivos na pele Dados já existentes sobre efeitos no ser humano e/ou em animais, e/ou dados <i>in vitro</i> obtidos por métodos validados reconhecidos internacionalmente, revelam efeitos irritantes severos na pele	Lesões oculares severas Irritação ocular Ausência de corrosão/ irritação ocular Corrosão da pele Irritação severa da pele	Critério decisivo; considerar corrosivo ocular. Não são necessários ensaios. Critério decisivo; considerar irritante ocular. Não são necessários ensaios. Critério decisivo; considerar não-corrosivo e não-irritante ocular. Não são necessários ensaios. Corrosivo ocular presumível. Não são necessários ensaios. Irritante ocular presumível. Não são necessários ensaios.
	↓		
	Informação indisponível ou a informação disponível não é conclusiva		
	↓		
2	Análise de relações estrutura-atividade para avaliar irritação/corrosão ocular Ponderação da análise de relações estrutura-atividade para avaliar corrosão da pele	Previsão de lesões oculares severas Previsão de irritação ocular Previsão de corrosão da pele	Corrosivo ocular presumível. Não são necessários ensaios. Irritante ocular presumível. Não são necessários ensaios. Corrosivo ocular presumível. Não são necessários ensaios.
	↓		
	Não é possível fazer previsões ou as previsões são inconclusivas ou negativas		
	↓		
3	Medição do pH (e do poder de tamponamento, se for caso disso)	pH ≤ 2 ou ≥ 11,5 (com elevado poder de tamponamento, se for caso disso)	Corrosivo ocular presumível. Não são necessários ensaios.
	↓		
	2 < pH < 11,5; ou pH ≤ 2,0 ou ≥ 11,5, mas com baixo ou nenhum poder de tamponamento, se for caso disso		
	↓		

	Atividade	Observação	Conclusão
4	Exame dos dados existentes de toxicidade sistémica por via dérmica	Elevada toxicidade às concentrações que seriam utilizadas no ensaio ocular.	Produto químico demasiado tóxico para ser ensaiado. Não são necessários ensaios.
	↓ <i>Informação indisponível ou o produto químico não é muito tóxico</i>		
5	Avaliação experimental do poder corrosivo na pele recorrendo à estratégia de ensaio descrita no capítulo B.4 deste anexo, se também necessário por exigências normativas	Reação corrosiva ou de irritação severa	Corrosivo ocular presumível. Não são necessários mais ensaios.
	↓ <i>O produto químico não corrói a pele nem provoca irritação severa da pele</i>		
6	Realização de um ou mais ensaios oculares in vitro ou ex vivo validados e reconhecidos	Reação corrosiva ou de irritação severa	Corrosivo ocular ou irritante ocular severo presumível, desde que o ensaio realizado seja utilizável na identificação de produtos químicos corrosivos/irritantes severos e o produto químico esteja dentro do domínio de aplicabilidade do ensaio. Não são necessários mais ensaios.
		Reação de irritação	Irritante ocular presumível, desde que o ensaio ou ensaios realizados sejam utilizáveis na correta identificação de produtos químicos corrosivos, irritantes severos e irritantes e o produto químico esteja dentro do domínio de aplicabilidade do(s) ensaio(s). Não são necessários mais ensaios.
		Ausência de irritação	Não-irritante ocular presumível, desde que o ensaio ou ensaios realizados sejam utilizáveis na correta identificação de produtos químicos não-irritantes, distinguindo-os corretamente de produtos químicos irritantes, irritantes severos e corrosivos oculares, e o produto químico esteja dentro do domínio de aplicabilidade do(s) ensaio(s). Não são necessários mais ensaios.
	↓ <i>Para chegar a uma conclusão, não é possível recorrer a um ou mais ensaios oculares in vitro ou ex vivo validados e reconhecidos</i>		
7	Realização de um ensaio ocular in vivo inicial num único coelho	Lesões oculares severas	Considerar corrosivo ocular. Não são necessários mais ensaios.
	↓ <i>Não ocorrem lesões severas ou não há reação</i>		
	↓		

	Atividade	Observação	Conclusão
8	Realização de um ensaio de confirmação nou- tro coelho ou noutros dois coelhos	Corrosão ou irritação	Considerar corrosivo ou irritante ocular. Não são necessários mais ensaios.
		Ausência de corrosão e de irritação	Considerar não-irritante e não-corrosivo ocular. Não são necessários mais ensaios.

REFERÊNCIAS

- 1) OCDE (1996). OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Realizado em Solna, Suécia, de 22 a 24 de janeiro de 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- 2) OCDE (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, novembro de 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- 3) Worth, A.P., Fentem, J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. *ATLA*, 27, 161-177.
- 4) Capítulo B.4 deste anexo, «Toxicidade aguda: irritação/corrosão dérmica»
- 5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19-26.
- 6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G., Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in vitro*, 12, pp. 483-524.
- 7) Neun, D.J. (1993). Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.*, 12, 227-231.
- 8) Suplemento ao capítulo B.4 deste anexo, «Uma Estratégia de Ensaio Sequencial para a Irritação e Corrosão Dérmica»
- 9) Capítulo B.40 deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio da resistência elétrica transcutânea (RET)»
- 10) Capítulo B.40-A deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio em modelos de pele humana»
- 11) OCDE (2006). *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OCDE, Paris.
- 12) Capítulo B.47 deste anexo, «Método de ensaio de opacidade e permeabilidade da córnea em bovinos para identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves»
- 13) Capítulo B.48 deste anexo, «Método de ensaio em olhos de frango isolados para identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves».

3) Na parte B, o capítulo B.10 é substituído pelo seguinte texto:

«B.10 Ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas em mamíferos

INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline 473* (2016) da OCDE. Faz parte integrante de uma série de métodos de ensaio no domínio da toxicologia genética. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente efetuadas às orientações da OCDE nesse domínio (1).

O objetivo do ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas é identificar os produtos químicos que causam aberrações cromossómicas estruturais em culturas de células de mamíferos (2) (3) (4). As aberrações estruturais podem ser de dois tipos — cromossómicas ou cromatídicas. Em ensaios *in vitro* de aberrações cromossómicas pode observar-se poliploidia (incluindo endoreduplicação). Embora os aneugénios possam induzir a poliploidia, esta, por si só, não é um indicativo do potencial aneugénico, podendo indicar simplesmente uma perturbação do ciclo celular ou citotoxicidade (5). O presente ensaio não é concebido para detetar a aneuploidia. Para esse fim, é recomendável um ensaio *in vitro* de micronúcleos (6).

O ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas pode utilizar culturas de linhas celulares bem estabelecidas ou culturas primárias de células humanas ou de roedores. As células utilizadas devem ser selecionadas com base na sua capacidade de crescimento em cultura, na estabilidade do cariótipo (incluindo o número de cromossomas) e na frequência das aberrações cromossómicas espontâneas (7). Os dados atualmente disponíveis não permitem efetuar recomendações sólidas, mas sugerem que, ao avaliar os perigos químicos, é importante considerar o estatuto da proteína p53, a estabilidade genética (do cariótipo), a capacidade de reparação do ADN e a origem (roedores ou humanos) das células escolhidas para a realização do ensaio. Os utilizadores do presente método de ensaio são, assim, incentivados a ponderar a influência destas e de outras características celulares no desempenho de uma linha celular, ao detetarem a indução de aberrações cromossómicas, dada a evolução constante dos conhecimentos nesta área.

As definições utilizadas figuram no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

Os ensaios *in vitro* necessitam, normalmente, de uma fonte exógena de ativação metabólica, a menos que as células sejam metabolicamente competentes em relação aos produtos químicos em estudo. O sistema exógeno de ativação metabólica não reproduz inteiramente as condições *in vivo*. Deve ter-se o cuidado de evitar condições que possam conduzir a falsos resultados positivos, ou seja, danos cromossómicos não causados pela interação direta entre os produtos químicos em estudo e os cromossomas, condições essas que incluem alterações do pH ou da pressão osmótica (8) (9) (10), a interação com os componentes do meio (11) (12) ou níveis excessivos de citotoxicidade (13) (14) (15) (16).

O presente ensaio é utilizado para a deteção de aberrações cromossómicas que possam resultar de eventos clastogénicos. A análise da indução de aberrações cromossómicas deve utilizar células em metáfase. É, pois, essencial que as células atinjam a mitose tanto em culturas tratadas como não tratadas. No caso dos nanomateriais fabricados, podem ser necessárias adaptações específicas ao presente método de ensaio, que não são descritas no mesmo.

Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados com fins regulamentares, importa ponderar se, e em caso afirmativo, por que motivo, o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Tais considerações não são necessárias se existir um requisito regulamentar para o ensaio da mistura.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

Expõem-se culturas de células humanas ou de outros mamíferos ao produto químico em estudo, juntamente com uma fonte exógena de ativação metabólica e sem essa fonte, a menos que se utilizem células com capacidade metabólica adequada (ver ponto 13). Após um período adequado, pré-estabelecido, de exposição das células ao produto químico em estudo, adiciona-se um produto para o bloqueio em metáfase (por exemplo, Colcemid ou colquicina); as células em metáfase são colhidas, coradas e analisadas microscopicamente para detetar a presença de aberrações cromatídicas ou cromossómicas.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparações

Células

Podem utilizar-se várias linhas celulares — por exemplo, células de ovário de hamster chinês (CHO, do inglês *Chinese Hamster Ovary*), células pulmonares de hamster chinês (CHL, do inglês *Chinese Hamster Lung*)/IU, TK6 — ou culturas celulares primárias, incluindo linfócitos do sangue periférico humano ou de outros mamíferos (7). A escolha das linhas celulares utilizadas deve ser justificada cientificamente. Se forem utilizadas células primárias, deve ponderar-se, sempre que possível e por razões de bem-estar dos animais, a utilização de células primárias de origem humana, obtidas em conformidade com os princípios éticos e regulamentares. Os linfócitos de sangue humano periférico devem provir de indivíduos jovens (18-35 anos), não fumadores, sem qualquer doença conhecida ou exposição recente a agentes genotóxicos (p. ex., produtos químicos, radiações ionizantes) a níveis suscetíveis de aumentar a incidência de base de aberrações cromossómicas. Desta forma, assegura-se uma incidência de base de aberrações cromossómicas baixa e coerente. A incidência de base de aberrações cromossómicas aumenta com a idade, sendo esta tendência mais pronunciada no sexo feminino do que no sexo masculino (17) (18). Se forem reunidas para utilização células de mais do que um dador, deve indicar-se o número de dadores. É necessário demonstrar que as células se dividiram desde o início do tratamento com o produto químico em estudo até à colheita das células. As culturas celulares são mantidas numa fase de crescimento exponencial (linhas celulares) ou estimuladas para se dividirem (culturas primárias de linfócitos), de forma a que as células sejam expostas em fases diferentes do ciclo celular, uma vez que a sensibilidade das fases celulares aos produtos químicos em estudo pode não ser conhecida. As células primárias que necessitam de ser estimuladas com agentes mitogénicos para se dividirem não são sincronizadas durante o período de exposição ao produto químico em estudo (caso, p. ex., dos linfócitos humanos após 48 horas de estimulação mitogénica). A utilização de células sincronizadas durante o tratamento não é recomendada, mas pode ser aceitável se se justificar.

Meios e condições de cultura

Devem manter-se as culturas em meios de cultura e condições de incubação adequados (tipo de recipiente, atmosfera humidificada com uma concentração de CO₂ de 5 %, se pertinente, temperatura de incubação 37 °C). As linhas celulares devem ser periodicamente verificadas quanto à estabilidade do número modal de cromossomas e à ausência de contaminação por micoplasmas (7) (19), não devendo ser utilizadas se se verificar que foram contaminadas ou que o número modal de cromossomas se alterou. A duração do ciclo celular normal das linhas celulares ou das culturas primárias utilizadas no laboratório de ensaio deve ser estabelecida e ser compatível com as características celulares publicadas (20).

Preparação das culturas

Linhas celulares: as células são propagadas a partir de culturas de arranque, inoculadas no meio de cultura a uma densidade tal que as células em suspensão ou em monocamadas continuem a crescer exponencialmente até ao momento da colheita (deve evitar-se, p. ex., a confluência no caso do crescimento de células em monocamadas).

Linfócitos: cultiva-se (p. ex., durante 48 horas, no caso dos linfócitos humanos) sangue integral, tratado com um anticoagulante (p. ex., heparina), ou linfócitos separados, na presença de um agente mitogénico (p. ex., fito-hemaglutinina — PHA — para linfócitos de origem humana) destinado a induzir a divisão celular, antes da exposição ao produto químico em estudo.

Ativação metabólica

Se forem utilizadas células com capacidade metabólica endógena inadequada, será necessário utilizar sistemas metabolizantes exógenos. O sistema mais geralmente utilizado e que se recomenda por defeito, exceto motivo em contrário, é uma fração pós-mitocondrial reforçada com co-fator (S9) preparada a partir de fígados de roedores (em geral, ratos) tratados com agentes de indução enzimática, como, por exemplo, Aroclor 1254 (21) (22) (23) ou uma mistura de fenobarbital e β -naftoflavona (24) (25) (26) (27) (28) (29). Esta última combinação não é contrária à Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (30) e comprovou-se ser tão eficaz na indução de oxidases de função mista como o Aroclor 1254 (24) (25) (26) (28). A fração S9 é habitualmente utilizada em concentrações na gama de 1 % a 2 %, mas pode ser aumentada para a 10 % (v/v) no meio de ensaio final. Durante o tratamento, deve evitar-se a utilização de produtos que reduzem o índice mitótico, em especial complexantes de cálcio (31). A escolha do tipo e da concentração de sistema exógeno de ativação metabólica ou do indutor metabólico utilizado pode ser influenciada pela classe dos produtos químicos em estudo.

Preparação do produto químico em estudo

Os produtos químicos sólidos devem ser adicionados a solventes adequados e, se necessário, ser diluídos antes do tratamento das células (ver ponto 23). Os produtos químicos líquidos podem ser adicionados diretamente ao sistema de ensaio e/ou diluídos antes de serem utilizados no tratamento do sistema de ensaio. Para o ensaio de produtos químicos gasosos ou voláteis, devem efetuar-se alterações adequadas aos protocolos normalizados, como o tratamento em recipientes de cultura fechados (32) (33) (34). A preparação do produto químico em estudo deve ser feita imediatamente antes do tratamento, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o mesmo pode ser armazenado.

Condições de realização do ensaio

Solventes

O solvente deve ser escolhido de modo a otimizar a solubilidade dos produtos químicos em estudo sem afetar negativamente a realização do ensaio, por exemplo, alterando o crescimento celular, afetando a integridade do produto químico em estudo, reagindo com os recipientes de cultura ou alterando o sistema de ativação metabólica. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente (ou meio de cultura) aquoso. A água e o dimetilsulfóxido, por exemplo, são solventes cujo desempenho é bem conhecido. Os solventes orgânicos não devem exceder, em geral, 1 % (v/v), e os solventes aquosos (salinos ou água) não devem exceder 10 % (v/v) no meio de tratamento final. Se forem utilizados solventes cujo desempenho não é bem conhecido (p. ex., etanol ou acetona), devem fornecer-se dados que comprovem a respetiva compatibilidade com os produtos químicos e o sistema em estudo e a inexistência de genotoxicidade à concentração utilizada. Na ausência de dados comprovativos, é importante incluir amostras de controlo não tratadas (ver apêndice 1) para demonstrar que o solvente escolhido não tem efeitos deletérios ou clastogénicos.

Medição da proliferação celular e da citotoxicidade e escolha das concentrações de tratamento

Ao determinar a concentração máxima a ensaiar do produto químico em estudo, devem evitar-se concentrações capazes de gerar respostas positivas falsas, como as que produzam citotoxicidade excessiva (ver ponto 22), precipitações no meio de cultura (ver ponto 23) ou alterações pronunciadas do pH ou da pressão osmótica (ver ponto 5). Se, ao ser adicionado, o produto químico em estudo causar uma alteração pronunciada do pH do meio, o pH pode ser ajustado por tamponamento do meio final, de modo a evitar falsos resultados positivos e manter condições de cultura adequadas.

Efetuem-se medições da proliferação celular para garantir que um número suficiente de células tratadas atingiu a mitose durante o ensaio e que os tratamentos são efetuados a níveis adequados de citotoxicidade (ver pontos 18 e 22). A citotoxicidade deve ser determinada na experiência principal tanto na presença como na ausência de um sistema de ativação metabólica, por recurso a um indicador adequado da morte e do crescimento celulares. Embora a avaliação da citotoxicidade num ensaio inicial possa ser útil para definir melhor as concentrações a utilizar no ensaio principal, esse ensaio não é obrigatório. Se for efetuado, não deve substituir a determinação da citotoxicidade no ensaio principal.

A duplicação da população em termos relativos (RPD, de «Relative Population Doubling») ou o aumento relativo da contagem celular (RICC, de «Relative Increase in Cell Count») são métodos adequados para a avaliação da citotoxicidade em ensaios citogenéticos (13) (15) (35) (36) (55) (ver fórmulas no apêndice 2). Em caso de tratamento a longo prazo e tempos de colheita após o início do tratamento superiores a 1,5 ciclos celulares normais (ou seja, mais de 3 ciclos celulares, no total), a RPD pode levar a uma subestimação da citotoxicidade (37). Nestas condições, a RICC pode constituir uma melhor estimativa; a avaliação da citotoxicidade após 1,5 ciclos celulares normais proporcionaria uma estimativa útil com recurso à RPD.

Relativamente aos linfócitos em culturas primárias, embora o índice mitótico (IM) seja uma medida dos efeitos citotóxicos/citostáticos, é influenciado pelo tempo decorrido após o tratamento, o agente mitogénico utilizado e as eventuais perturbações do ciclo celular. Contudo, o IM é aceitável porque as medições de citotoxicidade de outros tipos podem revelar-se fastidiosas ou impraticáveis, podendo não ser aplicáveis à população-alvo de linfócitos em crescimento devido à estimulação com PHA.

Embora a RICC e a RPD, no caso de linhas celulares, e o IM, no caso da cultura primária de linfócitos, sejam os parâmetros de citotoxicidade recomendados, outros indicadores de citotoxicidade (p. ex., integridade das células, apoptose, necrose, ciclo celular) podem fornecer informações adicionais úteis.

Devem avaliar-se, pelo menos, três concentrações de ensaio (não incluindo os controlos positivos e do solvente) que cumpram os critérios de aceitabilidade em termos de citotoxicidade adequada, número de células, etc. Independentemente do tipo de células (linhas celulares ou culturas primárias de linfócitos), podem utilizar-se, para cada concentração de ensaio, replicados ou culturas de tratamento único. Embora seja aconselhável a utilização de culturas em duplicado, as culturas únicas são igualmente aceitáveis desde que seja contado o mesmo número total de células nas culturas única ou em duplicado. O recurso a uma única cultura é particularmente importante quando são avaliadas mais de três concentrações (ver ponto 31). Os resultados obtidos com as culturas replicadas independentes, a uma dada concentração, podem ser agrupados para fins de análise de dados (38). No caso dos produtos químicos que demonstrem pouca ou nenhuma citotoxicidade, são adequados intervalos entre concentrações espaçados por um fator de 2 a 3. Quando se observa citotoxicidade, as concentrações escolhidas devem abranger uma gama com início na concentração que produz citotoxicidade, conforme descrito no ponto 22, e inclua as concentrações às quais se observa pouca ou nenhuma citotoxicidade. Muitos produtos químicos em estudo apresentam curvas concentração-resposta com declive acentuado, pelo que, para obter dados a citotoxicidade baixa e moderada, ou para analisar em pormenor a relação dose-resposta, será necessário recorrer a concentrações menos espaçadas e/ou a mais de três concentrações (no caso de culturas únicas ou de replicados), em especial nas situações em que for necessário repetir o ensaio (ver ponto 47).

Se a concentração máxima se basear na citotoxicidade, a concentração mais elevada deverá visar 55 ± 5 % de citotoxicidade, utilizando os parâmetros de citotoxicidade recomendados (ou seja, a redução do RICC e RPD, no caso das linhas celulares, e a redução do IM, no caso das culturas primárias de linfócitos, para 45 ± 5 % da amostra de controlo negativa correspondente). Os resultados positivos observados apenas no segmento superior da gama de 55 ± 5 % de citotoxicidade devem ser interpretados com cuidado (13).

No caso de produtos químicos pouco solúveis que não sejam citotóxicos a concentrações inferiores à concentração insolúvel mínima, a maior concentração analisada deve produzir, no final do tratamento com a substância química em estudo, turbidez ou um precipitado visível a olho nu ou com o auxílio de um microscópio invertido. Mesmo no caso de se observar citotoxicidade acima da menor concentração insolúvel, é conveniente ensaiar uma única concentração que produza turbidez ou um precipitado visível, devido aos efeitos falsos que possam ser induzidos pelo precipitado. A concentração que produz um precipitado, devem tomar-se os devidos cuidados para assegurar que este não interfere com a realização do ensaio (p. ex., em termos de coloração ou contagem). Neste contexto, pode ser útil determinar a solubilidade no meio de cultura antes do ensaio.

Se não se observar precipitação nem citotoxicidade condicionante, a maior concentração ensaiada deve corresponder à menor das seguintes concentrações: 10 mM, 2 mg/ml ou 2 µl/ml (39) (40) (41). Se o produto químico em estudo não for de composição definida (caso, p. ex., de uma substância de composição desconhecida ou variável, de produtos de reação complexos ou de materiais biológicos (UVCB) (42), de extratos ambientais, etc.), a concentração de topo poderá ter de ser mais elevada (p. ex., 5 mg/ml) na ausência de citotoxicidade, para aumentar a concentração de cada um dos componentes. Importa, contudo, notar que estes requisitos podem diferir no caso de medicamentos para uso humano (43).

Grupos de controlo

Para cada colheita, devem também realizar-se controlos negativos paralelos (ver ponto 15), em que as células são expostas apenas ao solvente e ao meio de tratamento, procedendo-se do mesmo modo que num ensaio normal.

São necessários controlos positivos para demonstrar a capacidade do laboratório para identificar os clastogénios nas condições do protocolo de ensaio, bem como a eficácia do sistema exógeno de ativação metabólica, se pertinente. O quadro 1 apresenta exemplos de controlos positivos. Podem ser utilizados produtos químicos de controlo positivo alternativos, se tal se justificar. Dado que os ensaios de toxicidade genética com células de mamíferos *in vitro* são suficientemente normalizados, o recurso a controlos positivos pode limitar-se a um clastogénio que necessite de ativação metabólica. Desde que efetuada em simultâneo com o ensaio não-ativado, com a mesma duração de tratamento, esta resposta única do controlo positivo demonstrará a atividade do sistema de ativação metabólica e a capacidade de resposta do sistema de ensaio. No entanto, devem efetuar-se controlos positivos (sem S9) para os tratamentos a longo prazo, dado que a duração do tratamento diferirá da do ensaio com ativação metabólica. Cada amostra de controlo positiva deverá ser utilizada numa ou mais das concentrações a que se prevê um aumento detetável e reproduzível relativamente à base, a fim de demonstrar a sensibilidade do sistema de ensaio (ou seja, efeitos claros, mas que não permitam revelar de imediato ao operador a identidade das lâminas codificadas), e a resposta não deve ser comprometida pela citotoxicidade de modo a exceder os limites especificados no método de ensaio.

Quadro 1

Produtos químicos de referência recomendados para avaliação da competência de um laboratório e para a seleção dos controlos positivos.

Categoria	Produto químico	N.º CAS
1. Clastogénios ativos sem ativação metabólica		
	Metanossulfonato de metilo	66-27-3
	Mitomicina C	50-07-7
	N-óxido de 4-nitroquinolina	56-57-5
	Arabinósido de citosina	147-94-4
2. Clastogénios que necessitam de ativação metabólica		
	Benzo(a)pireno	50-32-8
	Ciclofosfamida	50-18-0

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Tratamento com o produto químico em estudo

As células em proliferação são expostas ao produto químico em estudo na presença e na ausência de um sistema de ativação metabólica.

Intervalo de amostragem das culturas

Para uma avaliação exaustiva, necessária para concluir um resultado negativo, as três seguintes condições experimentais devem ser aplicadas utilizando um tratamento curto com e sem ativação metabólica e um tratamento longo sem ativação metabólica (ver pontos 43, 44 e 45):

- As células são expostas ao produto químico em estudo, sem ativação metabólica, durante 3-6 horas, sendo colhidas a intervalos equivalentes a cerca de 1,5 ciclos celulares normais, a partir do início da exposição (18),
- As células são expostas ao produto químico em estudo, com ativação metabólica, durante 3-6 horas, sendo colhidas a intervalos equivalentes a cerca de 1,5 ciclos celulares normais, a partir do início da exposição (18),
- As células são expostas continuamente, sem ativação metabólica, até à amostragem, decorrido um período equivalente a 1,5 ciclos celulares normais. Certos produtos químicos (p. ex. análogos dos nucleósidos) podem ser detetados mais facilmente com tempos de exposição/colheita superiores a 1,5 ciclos celulares normais (24).

Caso a aplicação de uma das referidas condições experimentais conduza a uma resposta positiva, pode não ser necessário investigar nenhum dos outros regimes de tratamento.

Preparação dos cromossomas

As culturas de célula são tratadas com Colcemid ou colquicina, geralmente durante 1-3 horas antes da colheita. Cada cultura de células é colhida e processada separadamente para a preparação dos cromossomas. Preparação dos cromossomas envolve o tratamento hipotónico das células, seguido de fixação e coloração. No final do tratamento de três a seis horas, podem estar presentes células mitóticas em monocamadas (identificáveis pela sua forma arredondada e por se destacarem da superfície). Por se destacarem com facilidade, estas células podem perder-se quando da remoção do meio com o produto químico em estudo. Se existirem provas de um aumento substancial do número de células mitóticas relativamente aos controlos, que indique um provável bloqueio da mitose, as células devem ser recolhidas por centrifugação e adicionadas de novo às culturas, de modo a evitar a perda de células que se encontrem em mitose, bem como o risco da ocorrência de aberrações cromossómicas, no momento da colheita.

Análise

Todas as lâminas, incluindo as dos controlos positivos e negativos, devem ser independentemente codificadas antes da análise microscópica para a deteção de aberrações cromossómicas. Uma vez que os processos de fixação dão frequentemente lugar à perda de cromossomas por uma determinada proporção das células em metáfase, as células contadas devem apresentar um número de centrómeros igual ao número modal ± 2 .

Para se concluir que um produto químico em estudo dá um resultado claramente negativo, devem contabilizar-se, pelo menos, 300 metáfases bem espalhadas para cada concentração e para o controlo (ver ponto 45). A 300 células devem ser divididas equitativamente entre os replicados, quando forem utilizadas culturas em duplicado. Quando são utilizadas culturas simples por cada concentração (ver ponto 21), devem contar-se em cada cultura, pelo menos, 300 metáfases bem espalhadas. A contabilização de 300 células tem a vantagem de aumentar a representatividade estatística do ensaio, além de raramente permitir observar valores nulos (prevê-se que estes sejam da ordem de apenas 5 %) (44). O número de metáfases contabilizadas pode ser reduzido caso se observem números elevados de células com aberrações cromossómicas e o produto químico em estudo for considerado inequivocamente positivo.

As células com aberrações cromossómicas estruturais, incluindo e excluindo as lacunas, devem ser contabilizadas. As quebras e as lacunas são definidas no apêndice 1, cf. (45) (46). As aberrações cromatídicas e cromossómicas devem ser registadas separadamente e classificadas em subtipos (quebras, intercâmbios). Os procedimentos utilizados no laboratório devem assegurar que a análise de aberrações cromossómicas é efetuada por operadores com formação adequada, com avaliação inter pares, se for caso disso.

Embora o objetivo do ensaio consista na deteção de aberrações cromossómicas estruturais, deve registar-se a frequência de poliploidia e de endorreduplicação, quando ocorram (ver ponto 2).

Proficiência do laboratório

A fim de estabelecer um nível de experiência suficiente antes da utilização rotineira do ensaio, o laboratório deve ter efetuado uma série de experiências com produtos químicos de referência positivos que atuem por diferentes mecanismos, bem como vários controlos negativos (utilizando vários solventes ou veículos). As respostas observadas nos controlos positivos e negativos devem ser coerentes com as referências bibliográficas. Este critério não é aplicável a laboratórios com a experiência, isto é, que disponham de uma base de dados históricos, como definido no ponto 37.

Deve investigar-se uma seleção de produtos químicos de controlo positivos (ver quadro 1 no ponto 26), aplicados em tratamentos de curta e de longa duração na ausência de ativação metabólica, bem como num tratamento curto na presença de ativação metabólica, a fim de demonstrar a proficiência para detetar produtos químicos clastogénicos e determinar a eficácia do sistema de ativação metabólica. A gama de concentrações dos produtos químicos selecionados deve ser escolhida de forma a proporcionar aumentos reprodutíveis e dependentes da concentração relativamente à base, de forma a demonstrar a sensibilidade e a gama dinâmica do sistema de ensaio.

Dados históricos de controlo

O laboratório deve elaborar:

- Um historial da gama e distribuição dos controlos positivos,
- Um historial da gama e distribuição dos controlos negativos (amostras não tratadas, solvente).

Ao obter os primeiros dados para um historial de distribuição dos controlos negativos, os controlos negativos em paralelo devem ser coerentes com os dados de controlo publicados, caso existam. À medida que forem sendo adicionados mais dados experimentais à distribuição dos controlos, os controlos negativos em paralelo devem, de preferência, situar-se dentro dos limites de controlo de 95 % daquela distribuição (44) (47). A base de dados históricos de controlo negativo deve ser inicialmente constituída por um mínimo de 10 experiências, embora de preferência, seja constituída por, pelo menos, 20 experiências efetuadas em condições experimentais comparáveis. Os laboratórios devem utilizar métodos de controlo de qualidade como gráficos de controlo (p. ex., gráficos C ou gráficos de barras (48)), para identificar a variabilidade dos seus dados de controlo positivo e negativo e demonstrar que, no seu laboratório, a metodologia está «sob controlo» (44). Encontram-se na bibliografia (47) outras recomendações sobre a forma de obter e utilizar os dados históricos (critérios de inclusão e exclusão de dados em séries históricas e critérios de aceitação para um determinado ensaio).

Quaisquer alterações ao protocolo experimental devem ser ponderadas em função da sua coerência com as bases de dados históricos de controlo do laboratório. Quaisquer incoerências de monta devem traduzir-se na constituição de uma nova base de dados históricos de controlo.

Os dados relativos ao controlo negativo devem ser constituídos pela frequência de células com aberrações cromossómicas numa única cultura ou na soma dos replicados das culturas, como descrito no ponto 21. Os controlos negativos em paralelo devem, de preferência, situar-se dentro dos limites de controlo de 95 % da distribuição da base de dados históricos de controlo negativo do laboratório (44) (47). Se os dados do controlo negativo realizado em paralelo se situarem fora dos limites de controlo de 95 % podem ser aceitáveis para inclusão no historial de distribuição de controlo se não forem valores extremos e houver indícios de que o sistema de ensaio está «sob controlo» (ver ponto 37), bem como provas da inexistência de erros humanos ou técnicos.

RESULTADOS E RELATÓRIO

Apresentação dos resultados

Deve avaliar-se a percentagem de células com aberrações cromossómicas estruturais. As aberrações cromatídicas e cromossómicas, classificados em subtipos (quebras, intercâmbios), devem ser indicadas separadamente, com indicação do respetivo número e frequência, no respeitante às culturas experimentais e de controlo. A ocorrência de lacunas é registada e incluída no relatório separadamente, mas não é contabilizada para o cálculo da frequência total das aberrações. Deve registar-se a percentagem de poliploidia e/ou de células endorreduplicadas, sempre que ocorram.

Durante a experiência principal para a deteção de aberrações, devem ser registadas as medições da citotoxicidade realizadas em paralelo com os ensaios, para todas as culturas de controlo e para os casos de resposta negativa e positiva.

Devem ser fornecidos dados individuais das culturas. Além disso, todos os dados devem ser apresentados sob a forma de um quadro.

Critérios de aceitabilidade

A aceitação do ensaio baseia-se nos seguintes critérios:

- A amostra de controlo negativo em paralelo é considerada aceitável para inclusão na base de dados históricos de controlo negativo do laboratório do modo descrito no ponto 39.
- As amostras de controlo positivo (ver ponto 26) devem induzir respostas compatíveis com as incluídas na base de dados históricos de controlo positivo e produzir um aumento estatisticamente significativo relativamente ao controlo negativo em paralelo.
- Devem respeitar-se os critérios de proliferação celular no controlo com solvente (pontos 17 e 18).
- Foram testadas as três condições experimentais, salvo se uma delas produziu resultados positivos (ver ponto 28).
- É analisável um número adequado de células e concentrações (pontos 31 e 21).
- Os critérios para a seleção da concentração de topo são coerentes com os descritos nos pontos 22, 23 e 24.

Avaliação e interpretação dos resultados

Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo se, em qualquer das condições experimentais examinadas (ver ponto 28):

- a) pelo menos uma das concentrações de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo,
- b) o aumento, avaliado com base numa análise de tendências adequada, for dependente da dose,
- c) nenhum dos resultados está fora da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson; ver ponto 39).

Se todos estes critérios estiverem preenchidos, o produto químico em estudo é considerado passível de induzir aberrações cromossómicas em células de mamífero cultivadas no presente sistema de ensaio. As referências bibliográficas (49) (50) (51) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados.

Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo se, em todas as condições experimentais examinadas (ver ponto 28):

- a) nenhuma das concentrações de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo,

- b) não se observa nenhum aumento dependente da dose, avaliado com base numa análise de tendências adequada,
- c) todos os resultados se situam dentro da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson; ver ponto 39).

O produto químico em estudo não é considerado passível de induzir aberrações cromossómicas em células de mamífero cultivadas no presente sistema de ensaio.

Não existe nenhuma exigência concreta para a verificação de uma resposta inequivocamente positiva ou negativa.

No caso de a resposta não ser inequivocamente positiva nem negativa como atrás descrito, ou para estabelecer a importância biológica do resultado, os dados devem ser avaliados por peritos e/ou uma investigação complementar. Neste contexto, pode ser útil a contagem de células adicionais (se adequado) ou a realização de uma nova experiência, eventualmente com alteração das condições experimentais (intervalo diferente entre as concentrações ou outras condições de ativação metabólica — p. ex., concentração ou origem do S9).

Em certos casos raros, mesmo após uma investigação complementar, os dados obtidos não permitirão concluir um resultado positivo ou negativo, pelo que se considerará que a resposta do produto químico em estudo é ambígua.

Um aumento do número de células poliploides pode indicar que o produto químico em estudo apresenta potencial de inibição da mitose e de indução de aberrações cromossómicas numéricas. Um aumento do número de células com cromossomas endorreduplicados pode indicar que o produto químico em estudo apresenta potencial de inibição da progressão do ciclo celular (54) (2) (ver ponto 2). Por conseguinte, deve registar-se separadamente a frequência de células poliploides e de células com cromossomas endorreduplicados.

Relatório de ensaio

Elementos a incluir no relatório de ensaio:

Produto químico em estudo:

- origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecida
- estabilidade do produto químico em estudo, se conhecida;
- solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente, se conhecida;
- medição do pH, da pressão osmótica e da quantidade de precipitado no meio de cultura ao qual foi adicionado o produto químico em estudo, consoante o que for adequado.

Substância monocomponente:

- aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas relevantes;
- dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, se justificado e exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

- caracterização, na medida do possível, da identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Solvente:

- justificação da escolha do solvente.
- deve igualmente indicar-se a percentagem de solvente no meio de cultura final.

Células:

- tipo e origem das células
- características do cariótipo e adequação do tipo de células utilizadas;
- ausência de micoplasmas, no caso das linhas celulares;
- no respeitante às linhas celulares, dados relativos à duração do ciclo celular, ao tempo de duplicação e ao índice de proliferação;
- sexo e idade dos dadores de sangue; quaisquer informações pertinentes sobre o dador, a utilização de sangue completo ou de linfócitos e o agente mitogénico utilizado;
- no respeitante às linhas celulares, número de passagens (se conhecido);
- no respeitante às linhas celulares, métodos de manutenção das culturas;
- no respeitante às linhas celulares, número modal de cromossomas.

Condições de realização do ensaio:

- identificação e concentração do produto químico que bloqueia a metáfase; duração da exposição da célula,
- concentração do produto químico em estudo, expressa em concentração final no meio de cultura (p. ex., µg ou mg/ml ou mM do meio de cultura).
- justificação para a seleção das concentrações e do número de culturas, incluindo, por exemplo, dados sobre a citotoxicidade e sobre as limitações de solubilidade;
- composição dos meios e, quando aplicável, concentração de CO₂; teor de humidade;
- concentração (e/ou volume) de solvente e de produto químico em estudo adicionado ao meio de cultura;
- temperatura de incubação;
- tempo de incubação;
- duração do tratamento;
- tempo decorrido entre o tratamento e a colheita das células;
- densidade celular da cultura de arranque, quando aplicável;
- tipo e composição do sistema de ativação metabólica (fonte de S9, método de preparação da mistura de S9, concentração ou volume da mistura de S9 e de S9 no meio de cultura final, controlos de qualidade do S9);
- produtos químicos de controlo positivo e negativo; concentração final para cada condição de tratamento;
- métodos de preparação das lâminas e técnica de coloração utilizada;
- critérios de aceitabilidade dos ensaios;
- critérios de contabilização das aberrações;
- número de células em metáfase analisadas;
- métodos de medição da citotoxicidade;
- outros dados pertinentes relativos à citotoxicidade e ao método utilizado;
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo;
- métodos utilizados para determinar o pH, a pressão osmótica e a precipitação.

Resultados:

- número de células tratadas e número de células colhidas por cultura, se forem utilizadas linhas celulares
- medições de citotoxicidade (p. ex., RICC, RPD, IM); outras observações, se for caso disso;
- informações sobre a duração do ciclo celular, o tempo de duplicação e o índice de proliferação, no caso de linhas celulares;
- sinais de precipitação e instante da determinação;
- definição das aberrações observadas, incluindo as lacunas;
- número de células contadas, número de células com aberrações cromossómicas e tipo dessas aberrações, discriminados para cada cultura exposta e de controlo, incluindo e excluindo lacunas;
- alterações da ploidia (células poliploides e as células com cromossomas endorreduplicados, apresentadas separadamente), se for caso disso;
- relação concentração-resposta, quando for possível determiná-la;
- dados (concentrações e solventes) relativos aos controlos em paralelo, negativo (solvente) e positivo;
- dados históricos relativos aos controlos negativo (solvente) e positivo, indicando intervalos, médias e desvios-padrão e limites de controlo de 95 % para a distribuição, bem como o número de dados;
- análise estatística; valores p (probabilidade de significância), caso sejam conhecidos.

*Discussão dos resultados.**Conclusões.*

BIBLIOGRAFIA

- 1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OCDE, Paris.
- 2) Evans, H.J. (1976), «Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens» in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 1-29
- 3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), «The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture» in *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. *et al.* (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pp. 427-432.
- 4) Galloway, S.M. *et al.* (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- 5) Muehlbauer, P.A. *et al.* (2008), «Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods», *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318-327.
- 6) Capítulo B.49 do presente anexo: Ensaio *in vitro* de micronúcleos em células de mamíferos.
- 7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.
- 8) Scott, D. *et al.* (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pp. 147-204.

- 9) Morita, T. *et al.* (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297-305.
- 10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.
- 11) Long, L.H. *et al.* (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.
- 12) Nessler, F. *et al.* (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439-452.
- 13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191-201.
- 14) Kirkland, D. *et al.* (2005), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pp. 1-256.
- 15) Greenwood, S. *et al.* (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36-44.
- 16) Hilliard, C.A. *et al.* (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316-326.
- 17) Hedner K. *et al.* (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305-309.
- 18) Ramsey M.J. *et al.* (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95-106.
- 19) Coecke S. *et al.* (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261-287.
- 20) Henderson, L. *et al.* (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp.163-167.
- 21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347-363.
- 22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.
- 23) Natarajan, A.T. *et al.* (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Research*, Vol. 37/1, pp. 83-90.
- 24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277-290.
- 25) Ong, T.-m. *et al.* (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.

- 26) Elliot, B.M. *et al.* (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175-177.
- 27) Matsushima, T. *et al.* (1976), «A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems», in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- 28) Galloway, S.M. *et al.* (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241-261.
- 29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28/1, pp. 51-59.
- 30) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Disponível no seguinte endereço: <http://www.pops.int/>.
- 31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225-8.
- 32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), «CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids», in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.
- 33) Zamora, P.O. *et al.* (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.
- 34) Asakura, M. *et al.* (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.
- 35) Lorge, E. *et al.* (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.
- 36) Galloway, S. *et al.* (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77-83.
- 37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, pp. 86-87.
- 38) Richardson, C. *et al.* (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays*. In: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- 39) OCDE (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Disponível mediante pedido.
- 40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pp. 32-56.
- 41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

- 42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
 - 43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponível no seguinte endereço: <https://federalregister.gov/a/2012-13774>.
 - 44) OCDE (2014), «Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS)», Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.
 - 45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.
 - 46) Scott, D. et al. (1990), «Metaphase chromosome aberration assays in vitro» in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.
 - 47) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
 - 48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.
 - 49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.
 - 50) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
 - 51) Richardson, C. et al. (1989), «Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays» in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
 - 52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 29-46.
 - 53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pp. 403-413.
 - 54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin — induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pp. 1362-1364.
 - 55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 312, pp. 139-149.
-

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Aneuploidia: desvio, num único ou em mais cromossomas, mas não por séries completas de cromossomas (poliploidia), do número diploide (ou haploide) normal de cromossomas.

Apoptose: morte celular programada, caracterizada por uma série de etapas conducentes à desintegração das células em partículas envolvidas por membranas, que são em seguida eliminadas por fagocitose ou excreção.

Proliferação celular: aumento do número de células por divisão celular mitótica.

Produto químico: substância ou mistura.

Quebra cromatídica: descontinuidade de um único cromatídeo em que se verifica um claro desalinhamento de um dos cromatídeos.

Lacuna cromatídica: região não corada (lesão acromática) de um único cromatídeo em que se verifica um desalinhamento mínimo do mesmo.

Aberração cromatídica: lesão estrutural de um cromossoma expressa na quebra, ou na quebra seguida de união, de cromatídeos simples.

Aberração cromossómica: lesão estrutural de um cromossoma expressa na quebra, ou na quebra seguida de união, de ambos os cromatídeos no mesmo local.

Clastogénio: produto químico causador de aberrações cromossomáticas estruturais em populações celulares ou organismos eucarióticos.

Concentrações: refere-se às concentrações finais do produto químico em estudo no meio de cultura.

Citotoxicidade: no respeitante aos ensaios abrangidos pelo presente método de ensaio que utilizam linhas celulares, a citotoxicidade é definida como uma redução na duplicação da população em termos relativos (RPD) ou um aumento da contagem celular (RICC) das células tratadas relativamente à amostra de controlo negativo (ver ponto 17 e apêndice 2). No respeitante aos ensaios abrangidos pelo presente método de ensaio que utilizam culturas primárias de linfócitos, a citotoxicidade é definida como uma redução do índice mitótico (IM) das células tratadas relativamente à amostra de controlo negativo (ver ponto 18 e apêndice 2).

Endorreduplicação: processo mediante o qual, na sequência de um período S de replicação do ADN, o núcleo não sofre mitose, iniciando-se um novo período S, que resulta em cromossomas com 4, 8, 16, ... cromatídeos.

Genotóxico: termo geral que abrange todos os tipos de danos no ADN ou nos cromossomas, incluindo quebras, supressão de segmentos, aduções, ligações e alterações nucleotídicas, rearranjos, mutações génicas, aberrações cromossomáticas e aneuploidia. Nem todos os tipos de efeitos genotóxicos originam mutações ou danos cromossomáticos estáveis.

Índice mitótico (IM): relação entre o número de células em metáfase e o número total de células observadas numa população de células, que fornece uma indicação do grau de proliferação da população em causa.

Mitose: divisão do núcleo celular, habitualmente subdividida em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase.

Mutagénico: que produz uma alteração hereditária de sequências de pares de bases do ADN em genes, ou da estrutura dos cromossomas (aberrações cromossomáticas).

Aberração numérica: alteração do número de cromossomas relativamente ao número de cromossomas característico das células utilizadas.

Poliploidia: aberrações cromossomáticas numéricas em células ou organismos, que abrangem uma ou mais séries completas de cromossomas — por oposição à aneuploidia, que abrange um ou mais cromossomas.

Estatuto da proteína p53: A proteína p53 participa na regulação do ciclo celular, na apoptose e na reparação do ADN. As células com défice de proteína funcional p53, incapazes de bloquear o ciclo celular ou de eliminar as células danificadas por apoptose ou por outros mecanismos (p. ex., indução de reparação do ADN) relacionados com as funções do p53 em resposta a danos no ADN, devem, em teoria, ser mais atreitas a mutações genéticas ou a aberrações cromossómicas.

Aumento relativo da contagem celular («RICC», de «relative increase in cell count»): razão entre o aumento do número de células nas culturas expostas ao produto químico e o aumento do número de culturas não tratadas, expressa em percentagem.

Duplicação da população em termos relativos (em inglês «RPD», de «relative population doubling»): razão entre o aumento do número de duplicações de população nas culturas expostas ao produto químico e nas culturas não tratadas, expressa em percentagem.

Fração S9 de fígado: sobrenadante após centrifugação do homogeneizado de fígado a 9 000 g (extrato de fígado em bruto).

Mistura S9: mistura de fração S9 de fígado e co-fatores necessários à atividade enzimática metabólica.

Amostra de controlo do solvente: termo geral que define as culturas de controlo tratadas apenas com solvente, para dissolver o produto químico em estudo.

Aberração estrutural: alteração da estrutura dos cromossomas detetável por exame microscópico das células em metáfase, na forma de supressão de segmentos, de alterações de partes da sequência ou da troca de segmentos num cromátídeo ou entre cromátídeos.

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

Amostras de controlo não tratadas: culturas que não sujeitas a qualquer tratamento (com um produto químico em estudo ou solvente), mas são processadas simultaneamente e do mesmo modo que as culturas sujeitas a tratamento com o produto químico em estudo.

Apêndice 2

FÓRMULAS DE QUANTIFICAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Índice mitótico (IM):

$$\text{MI}(\%) = \frac{\text{Número de células mitóticas}}{\text{Número total de células contadas}} \times 100$$

Recomenda-se o recurso ao **aumento relativo da contagem celular (RICC)** ou à **duplicação da população em termos relativos (RPD)**, pois ambos os parâmetros têm em conta a proporção de células que sofreu divisão na população celular.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{Aumento do número de células nas culturas tratadas}(\text{final-início}))}{(\text{Aumento do número de células nas culturas de controlo}(\text{final-início}))} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{N}^\circ \text{ de duplicações de população nas culturas tratadas})}{(\text{N}^\circ \text{ de duplicações de população nas culturas de controlo})} \times 100$$

em que:

Duplicação da população = $[\log (\text{n.}^\circ \text{ de células após tratamento} \div \text{n.}^\circ \text{ inicial de células})] \div \log 2$

Por exemplo, um RICC ou uma RPD de 53 % corresponde uma citotoxicidade/citóstase de 47 % e uma citotoxicidade/citóstase de 55 %, determinada com base no IM, indica que o IM real é de 45 % do controlo.

Em qualquer caso, deve determinar-se o número de células antes do tratamento, bem como nas culturas tratadas e de controlo negativo.

Embora o RCC (isto é, número de células nas culturas tratadas/culturas de controlo) tenha sido utilizado como parâmetro de citotoxicidade no passado, deixou de ser recomendado, uma vez que pode subestimar a citotoxicidade.

Nas culturas de controlo negativas, a duplicação da população deve ser compatível com a exigência de colher as células, após tratamento, num instante equivalente a 1,5 ciclos celulares normais, devendo o índice mitótico ser suficientemente elevado para obter um número suficiente de células em mitose e calcular de um modo fiável a redução de 50 %.

- 4) Na parte B, o capítulo B.11 é substituído pelo seguinte texto:

«B.11 Ensaio de aberrações cromossómicas em células da medula de mamíferos

INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline 475* (2016) da OCDE. Faz parte integrante de uma série de métodos de ensaio no domínio da toxicologia genética. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente efetuadas às orientações da OCDE nesse domínio (1).

O ensaio *in vivo* de aberrações cromossómicas da medula óssea de mamíferos é particularmente importante para a avaliação da genotoxicidade, visto que, embora possam variar de espécie para espécie, os fatores do metabolismo *in vivo*, da farmacocinética e dos processos de reparação do ADN estão ativos e contribuem para as respostas. Os ensaios *in vivo* são igualmente úteis para a investigação suplementar da genotoxicidade detetada *in vitro*.

O ensaio de aberrações cromossómicas em células da medula de mamíferos é utilizado para a deteção de aberrações cromossómicas estruturais induzidas pelos produtos químicos em estudo em células da medula de animais, geralmente roedores — (2), (3), (4) e (5). As aberrações cromossómicas estruturais podem ser de dois tipos, um afetando os cromossomas, o outro os cromátídeos. Embora as aberrações genotóxicas induzidas por produtos químicos sejam, na sua maioria, cromatídicas, podem também ocorrer aberrações cromossómicas. As lesões cromossómicas e os eventos relacionados causam diversas doenças genéticas humanas, havendo provas substanciais de que, quando causam alterações nos oncogenes e nos genes supressores de tumores das células somáticas, estas lesões e os eventos relacionados têm influência na indução de cancro nos seres humanos e nos animais utilizados em experiências. Em ensaios de aberrações cromossómicas *in vivo* pode observar-se poliploidia (incluindo endorre-duplicação). Contudo, o aumento da poliploidia, por si só, não é indicativo do potencial aneugénico, podendo indicar simplesmente uma perturbação do ciclo celular ou citotoxicidade. O presente ensaio não é concebido para detetar a aneuploidia. Os ensaios *in vivo* e *in vitro* recomendados para a deteção de aneuploidia são, respetivamente, o ensaio *in vivo* de micronúcleos em eritrócitos de mamíferos (capítulo B.12 do presente anexo) e o ensaio *in vitro* de micronúcleos em células de mamíferos (capítulo B.49 do presente anexo).

As definições utilizadas figuram no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O presente ensaio utiliza, normalmente, roedores mas, em alguns casos, podem ser adequadas outras espécies, mediante justificação científica. A medula é o tecido objeto do ensaio, por se tratar de um tecido altamente vascularizado e conter uma população de células com grande ritmo de duplicação que podem ser facilmente isoladas e processadas. A justificação científica para a utilização de outras espécies que não ratos ou ratinhos deve constar do relatório. Se se utilizarem espécies que não sejam roedores, recomenda-se que a medição das aberrações cromossómicas da medula óssea seja integrada noutro ensaio de toxicidade adequado.

Se houver provas de que nem os produtos químicos em estudo nem os seus metabolitos entram em contacto com o tecido-alvo, o presente ensaio pode não ser adequado.

Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados com fins regulamentares, importa ponderar se — e, em caso afirmativo, por que motivo — o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Tais considerações são desnecessárias se houver um requisito regulamentar para o ensaio da mistura.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Os animais são expostos ao produto químico em estudo através de um modo de exposição apropriado. Ao cabo de um período pós-exposição adequado, eutanasiam-se (por métodos humanos). Antes da eutanásia, tratam-se com um agente fixador da metáfase (p. ex., colquicina ou colcemida). Fazem-se, seguidamente, preparações de cromossomas a partir de células da medula: após coloração, analisam-se as células em metáfase para detetar aberrações cromossómicas.

VERIFICAÇÃO DA PROFICIÊNCIA DO LABORATÓRIO

Determinação da proficiência

A fim de adquirir experiência suficiente com o ensaio antes da sua utilização rotineira, o laboratório deve demonstrar aptidão para reproduzir os resultados previstos com base nos dados publicados (p. ex., (6)), no respeitante à frequência das aberrações cromossómicas, com um mínimo de dois produtos químicos de controlo positivo (incluindo respostas fracas induzidas por baixas doses de controlos positivos), nomeadamente os resultados que constam do quadro 1, e com controlos compatíveis veículo/solvente (ver ponto 22). Nestas experiências devem utilizar-se doses que originem aumentos reprodutíveis e dependentes das doses e demonstrem a sensibilidade e a gama dinâmica do sistema de ensaio no tecido em causa (medula óssea), recorrendo ao método de classificação a utilizar no laboratório. Este requisito não é aplicável a laboratórios com experiência, isto é, que disponham de uma base de dados históricos, conforme definição nos pontos 10-14.

Dados históricos de controlo

Na determinação da proficiência, o laboratório deve estabelecer:

- um historial da gama e da distribuição dos controlos positivos, e
- um historial da gama e da distribuição dos controlos negativos.

Ao obter os primeiros dados para um historial da distribuição dos controlos negativos, os controlos negativos em paralelo devem ser coerentes com os dados de controlo eventualmente publicados. À medida que forem sendo adicionados mais dados experimentais ao historial de distribuição dos controlos, os controlos negativos em paralelo devem, de preferência, situar-se dentro dos limites de controlo de 95 % daquela distribuição. A base de dados históricos do laboratório sobre o controlo negativo deve ser estatisticamente sólida, a fim de garantir a capacidade do laboratório para avaliar a distribuição dos seus dados de controlo negativo. A bibliografia sugere que podem ser necessários, no mínimo, 10 ensaios, devendo, de preferência, efetuar-se, pelo menos, 20 ensaios em condições experimentais comparáveis. Os laboratórios devem utilizar métodos de controlo de qualidade como gráficos de controlo (p. ex., gráficos C ou gráficos de barras (7)), para identificar a variabilidade dos seus dados e demonstrar que, no seu laboratório, a metodologia está sob controlo. Encontram-se na bibliografia (8) outras recomendações sobre a forma de obter e utilizar os dados históricos (critérios de inclusão e exclusão de dados em séries históricas e critérios de aceitação para um determinado ensaio).

Se o laboratório não realizar um número suficiente de ensaios para estabelecer a distribuição estatisticamente sólida das amostras de controlo negativo (ver ponto 11) durante a determinação da proficiência (descrita no ponto 9), é aceitável que a distribuição possa ser definida nos primeiros ensaios de rotina. Esta abordagem deve seguir as recomendações enunciadas na bibliografia (8); os resultados de controlo negativo obtidos com estes ensaios devem ser coerentes com os dados de controlo negativo publicados.

Quaisquer alterações ao protocolo experimental devem ser ponderadas em função do seu impacto nos dados resultantes, que devem permanecer coerentes com as bases de dados históricos de controlo de que o laboratório dispõe. Apenas as incoerências mais expressivas devem traduzir-se na criação de uma nova base de dados históricos de controlo, caso um parecer de perito determine que a distribuição difere da anterior (ver ponto 11). Durante o novo processo, pode não ser necessária uma base de dados de controlo negativo completa para permitir a realização de um ensaio real, desde que o laboratório possa demonstrar que os valores de controlo negativo em paralelo permanecem coerentes com a base de dados anterior ou com os correspondentes dados publicados.

Os dados de controlo negativo devem consistir na incidência de aberrações cromossómicas estruturais (excluindo lacunas) em cada animal. Os controlos negativos em paralelo devem, de preferência, situar-se dentro dos limites de controlo de 95 % da distribuição da base de dados históricos do laboratório sobre o controlo negativo. Os dados do controlo negativo realizado em paralelo que se situem fora dos limites de controlo de 95 % são aceitáveis para inclusão no historial de distribuição de controlo se não forem valores extremos e ainda se houver indícios de que o sistema de ensaio está «sob controlo» (ver ponto 11) e não houver indícios da existência de erros humanos ou técnicos.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparações

Escolha da espécie animal

Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis das espécies de laboratório mais comuns. Utilizam-se geralmente ratos, embora possam também servir ratinhos. Pode utilizar-se qualquer outra espécie adequada de mamífero, se o relatório fornecer uma justificação científica.

Condições de alojamento e de alimentação dos animais

No caso dos roedores, a temperatura na sala onde se encontram os animais deve ser de 22 °C ($\pm$ 3 °C). Embora a humidade relativa ideal seja de 50-60 %, na prática pode descer a 40 %, não devendo exceder 70 %, exceto durante a lavagem do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 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 pela alimentação, a escolha da dieta poderá ser condicionada pela necessidade de assegurar a dosagem adequada. Os roedores devem ser alojados em pequenos grupos (não mais de cinco por gaiola) do mesmo sexo e grupo de tratamento — caso não se preveja nenhum comportamento agressivo —, de preferência em gaiolas com pavimento sólido e enriquecimento ambiental adequado. Os animais só podem ser alojados individualmente se tal se justificar do ponto de vista científico.

Preparação dos animais

Utilizam-se, como regra geral, animais adultos jovens saudáveis (no caso dos roedores, idealmente com 6-10 semanas de idade no início do tratamento, embora sejam aceitáveis animais ligeiramente mais velhos), distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos de exposição. Os animais são identificados de forma inequívoca, utilizando um método humano minimamente invasivo (p. ex., colocação de anilhas, marcações, *microchips* ou identificação biométrica, mas sem cortes nas orelhas ou nas falanges) e devem ser aclimatados às condições de laboratório durante, pelo menos, cinco dias. As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Deve evitar-se a contaminação cruzada pelo controlo positivo e pelo produto químico em estudo. No início do estudo, a variação de peso entre os animais deve ser mínima, não excedendo $\pm$ 20 % do peso médio de cada sexo.

Preparação das doses

Os produtos químicos em estudo na forma sólida devem ser dissolvidos ou suspensos em solventes ou veículos adequados, ou ainda misturados na dieta ou na água potável antes da sua administração aos animais. Os produtos químicos em estudo líquidos podem ser administrados diretamente ou diluídos antes da sua administração. No caso de exposições por inalação, os produtos químicos em estudo podem ser administrados sob a forma de gás, vapor ou aerossol sólido/líquido, consoante as respetivas propriedades físico-químicas. Devem utilizar-se preparações frescas do produto químico em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o mesmo pode ser armazenado e determinem as condições de armazenagem adequadas.

Solvente/veículo

O solvente/veículo não deve produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas nem ser suscetível de reagir com o produto químico em estudo. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização prioritária de um solvente/veículo aquoso. A água, o soro fisiológico, uma solução de metilcelulose, uma solução de sal de sódio de carboximetilcelulose, o azeite e o óleo de milho constituem exemplos de solventes/veículos compatíveis de utilização comum. Na ausência de dados de controlo históricos ou publicados que demonstrem que o solvente/veículo atípico escolhido não induz nenhuma aberração estrutural ou outros efeitos deletérios, deve realizar-se um ensaio preliminar destinado a estabelecer a aceitabilidade do controlo do solvente ou veículo.

Controlos

Amostras de controlo positivas

Como regra geral, deve incluir-se em cada ensaio um grupo de animais expostos a um produto químico de controlo positivo. Este princípio pode não ser respeitado caso o laboratório de ensaio tenha demonstrado aptidão para a realização do ensaio e estabelecido um historial de gamas de controlos positivos. Se não for incluído um grupo de controlo positivo paralelo, cada experiência deve compreender controlos de contagem (lâminas fixas e não coradas). Estes podem ser realizados mediante a inclusão, no estudo, de amostras de referência adequadas obtidas e armazenadas a partir de um controlo positivo em separado efetuado a intervalos regulares (p. ex., todos os 6-18 meses), no laboratório em que o ensaio é realizado: por exemplo, em testes de proficiência e, subsequentemente, de uma forma regular, se necessário.

Os produtos químicos de controlo positivo devem produzir, de forma fiável, um aumento detetável na frequência das células com aberrações cromossómicas estruturais em relação ao nível de ocorrência espontânea. A dose de controlo positiva a administrar deve ser escolhida de modo a que os seus efeitos sejam claros mas também a que as amostras codificadas não sejam imediatamente identificadas pelo operador que procede às leituras. É aceitável que o controlo positivo seja administrado por uma via diferente da substância em estudo, de acordo com um calendário diferente, e que a amostragem seja realizada num único instante. Se se justificar, deve considerar-se a possibilidade de utilizar produtos químicos de uma classe relacionada para o controlo positivo. O quadro 1 inclui exemplos de produtos químicos de controlo positivo.

Quadro 1

Exemplos de substâncias de controlo positivo

Produto químico	N.º CAS
Metanossulfonato de etilo	62-50-0
Metanossulfonato de metilo	66-27-3
Etilnitrosureia	759-73-9
Mitomicina C	50-07-7
Ciclofosfamida mono-hidratada	50-18-0 (6055-19-2)
Trietilenomelamina	51-18-3

Controlos negativos

Todas as amostragens devem incluir animais do grupo de controlo negativo, tratados do mesmo modo que os animais dos grupos de exposição, exceto o facto de não serem expostos à substância química em estudo. Se se utilizar um solvente/veículo para administrar o produto químico em estudo, o grupo de controlo deve receber esse solvente/veículo. No entanto, se os dados históricos de controlo negativo demonstrarem, para cada tempo de amostragem e laboratório de ensaio, a coerência da variabilidade entre animais e da frequência de células com aberrações estruturais, pode ser necessária apenas uma amostra de controlo negativo. Em caso de recurso a uma única amostragem para os controlos negativos, esta deve corresponder ao primeiro tempo de amostragem utilizado no estudo.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Número e sexo dos animais

Em geral, a resposta do micronúcleo é idêntica nos machos e nas fêmeas (9), prevendo-se que o mesmo se verifique no caso das aberrações cromossómicas estruturais; por conseguinte, os estudos podem, na sua maioria, ser realizados com animais de qualquer sexo. A existência de dados que demonstrem diferenças importantes entre machos e fêmeas (p. ex., diferenças em termos de toxicidade sistémica, metabolismo, biodisponibilidade, toxicidade para a medula óssea, etc., que incluam, nomeadamente, um estudo exploratório) recomenda a utilização de animais de ambos os sexos. Neste caso, poderá ser adequado um estudo com ambos os sexos: por exemplo, no contexto de um estudo de toxicidade de dose repetida. Pode justificar-se o recurso ao modelo fatorial caso se utilizem animais de ambos os sexos. O apêndice 2 debruça-se sobre a análise dos dados por recurso a este modelo.

A dimensão dos grupos deve ser estabelecida no início do estudo, para que se disponha de um mínimo de 5 animais analisáveis de um sexo ou (se se utilizarem ambos os sexos) de cada sexo, por grupo. Nos casos em que a exposição humana aos produtos químicos possa ser específica de cada sexo, como acontece com alguns produtos farmacêuticos, o ensaio deve ser executado com animais do sexo em causa. A título de orientação, um estudo com medula óssea realizado com dois tempos de amostragem, três grupos de doses e um grupo de controlo negativo em paralelo, além de um grupo de controlo positivo (composto por cinco animais do mesmo sexo), necessita, no máximo, de 45 animais.

Doses

Se for realizado um estudo preliminar para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados de apoio à seleção de doses, esse estudo deve ter lugar no mesmo laboratório, utilizando a mesma espécie, a mesma linha celular, o mesmo sexo e o mesmo regime de exposição do estudo principal (10). O estudo deve procurar identificar a dose máxima tolerável (DMT), definida como a dose mais elevada que se tolera sem sinais de toxicidade limitativa do estudo, relativamente à sua duração (p. ex., induzindo quebras do peso corporal ou citotoxicidade para o sistema hematopoiético), mas sem causar a morte nem sinais de dor, sofrimento ou tensão que levem à eutanásia por meios humanos (11).

Pode igualmente definir-se dose mais elevada como uma dose que produz indicações de toxicidade para a medula óssea.

Os produtos químicos que apresentam saturação de propriedades toxicocinéticas ou induzem processos de desintoxicação passíveis de conduzir a uma diminuição da exposição após um tratamento a longo prazo podem constituir uma exceção aos critérios de base de fixação da dose, devendo ser avaliados numa base casuística.

Um estudo completo destinado a obter informação sobre a resposta às doses deve incluir um grupo de controlo negativo e, no mínimo, três doses espaçadas, geralmente, por um fator de 2, mas não superior a 4. Se o produto químico em estudo não produzir efeitos tóxicos num estudo de avaliação da gama de doses ou com base em dados existentes, a dose mais elevada administrada de uma só vez deve ser de 2 000 mg/kg de peso corporal. Contudo, se o produto químico em estudo não provocar toxicidade, a DMT deve coincidir com a dose máxima administrada, e as doses utilizadas devem, de preferência, abranger uma gama compreendida entre a dose que produz a toxicidade máxima e uma dose que produz uma toxicidade baixa ou nula. Caso se observe toxicidade no tecido-alvo (medula óssea) com todas as doses de ensaio, recomenda-se a realização de um estudo complementar com doses não tóxicas. Os estudos destinados a caracterizar de modo mais preciso a informação quantitativa dose-resposta podem exigir outras gamas de doses. Estes limites podem variar para certos tipos de produtos químicos em estudo abrangidos por exigências específicas (p. ex., medicamentos para uso humano).

Ensaio no limite

Se os estudos de avaliação da gama de doses ou dados existentes relativos a espécies animais afins indicarem que um regime de tratamento com, pelo menos, a dose-limite (adiante descrita) não produz efeitos tóxicos observáveis (entre os quais a inibição da proliferação da medula óssea ou outros sinais de citotoxicidade no tecido-alvo) e não for de prever a ocorrência de genotoxicidade, com base em estudos de genotoxicidade *in vitro* ou dados referentes a produtos químicos estruturalmente afins, pode não ser necessário um estudo completo com três doses, desde que se tenha demonstrado que o(s) produto(s) químico(s) em estudo atinge(m) o tecido-alvo (medula óssea). Em tais casos, pode ser suficiente uma dose única (a dose-limite). Para um período de administração superior a 14 dias, a dose-limite é de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia. Para períodos de administração iguais ou inferiores a 14 dias, a dose-limite é de 2 000 mg/kg de peso corporal/dia.

Administração das doses

Na conceção de um ensaio, deve ponderar-se a via prevista de exposição humana. Por conseguinte, podem escolher-se, com justificação, vias de exposição como a alimentação, a água de beber, as vias tópica, subcutânea, intravenosa e oral (por sonda gástrica), a inalação, a via intratraqueal ou os implantes. Em qualquer caso, a via deve ser escolhida de modo a garantir a exposição adequada do(s) tecido(s)-alvo. A injeção intraperitoneal, não é, em geral, recomendada, pois não se trata de uma via prevista de exposição humana, só devendo utilizar-se com justificação científica específica. Se o produto químico em estudo for misturado na alimentação ou na água de beber, especialmente no caso de dose única, deve ter-se o cuidado de prever um intervalo suficiente entre a ingestão dos alimentos ou da água e a amostragem, para permitir detetar os efeitos (ver pontos 33-34). O volume máximo de líquido que pode ser administrado por gavagem (sonda gástrica) ou por injeção, numa toma, depende do tamanho do animal, não devendo exceder 1 ml/100 g de peso corporal; excetuam-se as soluções aquosas, que podem ser administradas na proporção máxima de 2 ml/100 g de peso corporal. Deve justificar-se a utilização de volumes mais elevados. Exceto no caso de produtos químicos irritantes ou corrosivos, que normalmente produzem efeitos exacerbados em concentrações superiores, a variabilidade no volume de ensaio deve ser minimizada ajustando a concentração de modo a garantir a administração a um volume constante relativamente à massa corporal, em todas as doses.

Programação do ensaio

Os produtos químicos em estudo são geralmente administrados numa exposição única, podendo, contudo, ser administrados em dose dividida (ou seja, duas ou mais exposições no mesmo dia, separadas por não mais de 2-3 horas), para facilitar a administração de grandes volumes. Nestas circunstâncias, ou no caso da administração do produto químico por inalação, a amostragem deve ser programada em função do momento da última administração ou do termo da exposição.

Há poucos dados disponíveis sobre a adequação ao presente ensaio de um protocolo por doses repetidas. Contudo, nos casos em que for desejável integrar este ensaio com um ensaio de toxicidade de dose repetida, deve ter-se o cuidado de evitar a perda de células mitóticas com danos cromossómicos, passível de ocorrer com doses tóxicas. Essa integração é aceitável se a dose mais elevada for igual ou superior à dose-limite (ver ponto 29) e for administrado um grupo de doses que abranja a dose-limite durante o período de tratamento. O ensaio do micronúcleo (método B.12) deve considerar-se o ensaio *in vivo* recomendado de aberrações cromossómicas quando se pretende a integração com outros estudos.

As amostras de medula óssea devem ser colhidas em dois momentos diversos após um único tratamento. No caso dos roedores, a primeira amostra deve ser colhida após o tempo necessário para completar 1,5 ciclos celulares normais, que é, normalmente, de 12-18 horas após a exposição. Dado que o tempo necessário para a absorção e para o metabolismo do(s) produto(s) químico(s) em estudo, bem como o seu efeito sobre a cinética do ciclo celular, podem afetar o momento ótimo para a deteção de uma eventual aberração cromossómica, recomenda-se a recolha de uma segunda amostra 24 horas após a primeira. A primeira amostragem para análise deve abranger todos os grupos de doses; no entanto, na(s) amostragem(ns) posterior(es) só será necessário administrar a dose mais elevada. Se, com justificação científica, forem utilizados regimes de administração ao longo de mais de um dia, deve, geralmente, colher-se uma amostra a cerca de 1,5 ciclos celulares normais após a exposição final.

Após a exposição e antes da amostragem, os animais são injetados intraperitonealmente com uma dose apropriada de um agente fixador da metáfase (por exemplo, colcemida ou colquicina), sendo as amostras colhidas após um período adequado. No caso dos ratinhos, esse período é de cerca de 3-5 horas e, no caso dos ratos, de 2-5 horas. As células da medula são colhidas, dilatadas, fixadas, coloridas e analisadas para deteção de aberrações cromossómicas.

Exames

Devem ser feitas observações clínicas gerais dos animais em estudo, registando-se os respetivos sinais clínicos pelo menos uma vez por dia, de preferência à(s) mesma(s) hora(s), tendo em conta o período de pico dos efeitos previstos após a administração da dose. Durante o período de exposição, devem observar-se todos os animais pelo menos duas vezes por dia, para a deteção de sinais de morbilidade e mortalidade. Todos os animais devem ser pesados no início do estudo, bem como, pelo menos, uma vez por semana (em estudos com doses repetidas) e no momento da eutanásia. Nos estudos com a duração mínima de uma 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, deve medir-se o consumo desta em cada mudança de água e pelo menos uma vez por semana. Os animais que exibam indicadores não letais de toxicidade excessiva devem ser eutanasiados (por métodos humanos) antes da conclusão do período de ensaio (11).

Exposição dos tecidos-alvo

Sempre que se justifique e nos casos em que não haja outros dados de exposição (ver ponto 44), deve colher-se uma amostra de sangue em momentos oportunos, a fim de permitir a determinação dos níveis dos produtos químicos em estudo no plasma, tendo em vista comprovar que ocorreu exposição da medula óssea.

Preparação da medula óssea e dos cromossomas

Imediatamente após a eutanásia (por métodos humanos), retiram-se células da medula óssea dos fémures ou das tíbias dos animais, expõem-se a uma solução hipotónica e fixam-se. As células em metáfase são depois espalhadas nas lâminas e coradas por métodos bem definidos [ver (3) (12)].

Análise

Todas as lâminas, incluindo as dos controlos positivos e negativos, devem ser codificadas independentemente antes da análise, a qual deve ser realizada de forma aleatória, para que o operador não conheça o tipo de tratamento.

Como medida da citotoxicidade, deve determinar-se o índice mitótico em pelo menos 1 000 células por animal, para todos os animais expostos à substância em estudo (incluindo os controlos positivos), para os animais não expostos e para os animais não expostos do controlo negativo com o veículo/solvente.

Devem analisar-se, pelo menos, 200 metáfases por animal, para pesquisa de aberrações cromossómicas estruturais, incluindo e excluindo lacunas (6). No entanto, se os dados históricos relativos ao controlo negativo indicarem que a frequência de aberrações cromossómicas estruturais de fundo no laboratório de ensaio é $< 1\%$, deve ponderar-se a contagem de células adicionais. Devem registar-se separadamente as aberrações cromatídicas e cromossómicas, classificando-as em subtipos (quebras, intercâmbios). Os procedimentos utilizados no laboratório devem assegurar que a análise de aberrações cromossómicas é efetuada por operadores com formação adequada, com avaliação inter pares se for caso disso. Dado que os procedimentos de preparação das lâminas dão frequentemente lugar à rutura de uma determinada proporção das células em metáfase, com perda dos cromossomas, as células contabilizadas devem, portanto, conter um número de centrómeros não inferior a $2n \pm 2$, em que n é o número de cromossomas haploides na espécie em causa.

RESULTADOS E RELATÓRIO

Tratamento dos resultados

Os dados respeitantes a cada animal devem ser apresentados num quadro. Para cada animal, devem fornecer-se o índice mitótico, o número de células em metáfase contabilizadas, o número de aberrações por cada célula em metáfase e a percentagem de células com aberrações cromossómicas estruturais. Os diferentes tipos de aberração cromossómica estrutural devem ser enumerados, com os respetivos números e frequências, para os grupos expostos à substância em estudo e os grupos de controlo. Registam-se separadamente as lacunas, bem como as células poliploides e as células com cromossomas endorreduplicados. A frequência das lacunas é incluída no relatório, mas em geral não é tida em conta na análise da frequência total das aberrações estruturais. Se não houver diferença visível entre os sexos no tocante à resposta, os dados podem ser combinados para fins estatísticos. Devem também comunicar-se os resultados da toxicidade em animais e os sinais clínicos.

CrITÉRIOS de aceitabilidade

CrITÉRIOS para determinar a aceitabilidade do ensaio:

- a) Os dados relativos à amostra de controlo negativo em paralelo são considerados aceitáveis para inclusão na base de dados históricos de controlo do laboratório (ver pontos 11-14).
- b) Os controlos positivos ou os controlos de contagem em paralelo devem induzir respostas compatíveis com as incluídas na base de dados históricos de controlo positivo e produzir um aumento estatisticamente significativo em comparação com o controlo negativo (ver pontos 20-21).
- c) O número de doses e células analisadas foi o adequado.
- d) Os critérios para a seleção da dose mais elevada são coerentes com os descritos nos pontos 25-28.

Avaliação e interpretação dos resultados

Caso se cumpram todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo se:

- a) Pelo menos um dos grupos de tratamento apresenta um aumento estatisticamente significativo da frequência de células com aberrações cromossómicas estruturais (excluindo lacunas), em comparação com o controlo negativo.
- b) Esse aumento, avaliado por recurso a uma análise adequada de tendências, depende da dose em, pelo menos, um dos tempos de amostragem.
- c) Todos os resultados estão fora da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson).

Se, num determinado tempo de amostragem, apenas se analisar a dose mais elevada, o produto químico em estudo é considerado claramente positivo caso se verifique um aumento estatisticamente significativo em comparação com o controlo negativo em paralelo e os resultados se situem fora da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson). A referência bibliográfica (13) contém recomendações sobre os métodos estatísticos adequados. Quando se efetua um estudo da resposta à dosagem, devem analisar-se, pelo menos, três grupos de doses tratados. Os testes estatísticos utilizados devem considerar que o animal constitui a unidade experimental. Um resultado positivo no ensaio de aberrações cromossómicas indica que o produto químico em estudo induz aberrações cromossómicas estruturais na medula óssea das espécies ensaiadas.

Se se cumprirem todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo caso, em todas as condições experimentais examinadas:

- a) Nenhum dos grupos de tratamento apresente um aumento estatisticamente significativo da frequência de células com aberrações cromossómicas estruturais (excluindo lacunas), em comparação com o controlo negativo,

- b) Não se observe nenhum aumento dependente da dose, avaliado com base numa análise de tendências adequada, para qualquer tempo de amostragem,
- c) Todos os resultados se situem dentro da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson), e
- d) Se verifique a exposição da medula ao(s) produto(s) químico(s) em estudo.

A referência bibliográfica (13) contém recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados. A prova da exposição das células da medula a um produto químico em estudo pode consistir numa depressão do índice mitótico ou na medição dos níveis do produto químico no plasma ou no sangue. Em caso de administração intravenosa, não são necessárias provas da exposição. Alternativamente, podem utilizar-se dados ADME obtidos no âmbito de um estudo independente, com recurso à mesma via e à mesma espécie, para demonstrar que ocorreu exposição da medula óssea. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, o produto químico em estudo não induz aberrações cromossómicas estruturais nas células da medula das espécies sujeitas ao ensaio.

Não há nenhuma exigência concreta para a verificação de uma resposta positiva clara ou de uma resposta negativa clara.

Nos casos em que a resposta não for inequivocamente negativa ou positiva, a fim de contribuir para a definição da importância biológica dos resultados (p. ex., um aumento ténue ou no limite), os dados devem ser avaliados por pareceres de peritos e/ou investigações complementares das experiências concluídas. Em alguns casos, poderá ser útil analisar mais células ou repetir o ensaio alterando as condições experimentais.

Em certos casos raros, mesmo após uma investigação complementar, os dados obtidos não permitem concluir um resultado positivo ou negativo, pelo que se considerará que o produto químico em estudo produz uma resposta ambígua.

A frequência de poliploidia e de metáfases endorreduplicadas entre as metáfases totais deve ser registada separadamente. Um aumento do número de células poliploides ou endorreduplicadas pode indicar que o produto químico em estudo apresenta o potencial de inibir a mitose ou a progressão do ciclo celular (ver ponto 3).

Relatório do ensaio

Elementos a incluir no relatório de ensaio:

Resumo

Produto químico em estudo:

- origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecida;
- estabilidade do produto químico em estudo, se conhecida.

Substância monocomponente:

- aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas relevantes;
- dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, se pertinente e exequível, etc.

Substância multicomponente, UVCB e misturas:

- caracterização, na medida do possível, da identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Preparação do produto químico em estudo:

- justificação da escolha do veículo;
- solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/veículo, se conhecida;
- preparação de fórmulas para a alimentação, a água de beber ou a inalação;
- determinações analíticas sobre essas fórmulas (p. ex.: estabilidade, homogeneidade, concentrações nominais), se efetuadas;

Animais utilizados no ensaio:

- espécie e estirpe utilizadas e justificação da utilização;
- número, idade e sexo;
- proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.;
- método de identificação específica dos animais;
- para estudos de curta duração: peso de cada animal no início e no final do ensaio; para estudos de duração superior a uma semana: peso corporal de cada animal durante o estudo e consumo de alimentos. Deve incluir-se, relativamente a cada grupo, a gama de pesos corporais, com a respetiva média e o desvio-padrão.

Condições de realização do ensaio:

- controlos positivos e negativos (veículo/solvente);
- dados do estudo para definição da gama de doses, se tiver sido realizado;
- fundamentação da escolha das doses;
- elementos relativos à preparação do produto químico em estudo;
- elementos relativos à administração do produto químico em estudo;
- fundamentação da escolha da via de administração e sua duração;
- métodos para verificar se o(s) produto(s) químico(s) em estudo atingiu(ram) a circulação geral ou a medula óssea;
- dose real (mg/kg de peso corporal/dia), calculada a partir da concentração do produto químico nos alimentos ou na água de beber (ppm) e do consumo, se aplicável;
- pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água;
- método de eutanásia;
- método analgésico (se utilizado);
- descrição detalhada dos calendários de tratamento e amostragem e justificação das escolhas feitas;
- métodos de preparação das lâminas;
- métodos de medição da toxicidade;
- identidade do agente fixador da metáfase, sua concentração, dose e tempo de administração antes da colheita das amostras;
- procedimentos para o isolamento e a conservação das amostras;
- critérios de contabilização das aberrações;

- número de células em metáfase analisadas por animal e número de células analisadas para a determinação do índice mitótico;
- critérios de aceitabilidade do estudo;
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou inconclusivo;

Resultados:

- condição do animal antes e durante o período de ensaio, incluindo sinais de toxicidade;
- índice mitótico, discriminado para cada animal;
- tipo e número de aberrações e de células aberrantes, discriminados para cada animal,
- número total de aberrações em cada grupo, com as respetivas médias e desvios-padrão;
- número de células aberrantes em cada grupo, com as respetivas médias e desvios-padrão;
- alterações da ploidia, quando observadas, incluindo as frequências de poliploidia e/ou de células endorreduplicadas;
- relação dose-resposta, quando possível de determinar;
- análises estatísticas e respetivos métodos;
- dados que comprovem a exposição da medula óssea;
- dados relativos aos controlos negativo e positivo realizados em paralelo com o ensaio, com as respetivas gamas, valores médios e desvios-padrão;
- dados históricos relativos aos controlos negativo e positivo, indicando intervalos, médias e desvios-padrão e limites de controlo de 95 % para a distribuição, bem como o período abrangido e o número de observações;
- critérios cumpridos para uma resposta positiva ou negativa.

Discussão dos resultados.

Conclusão.

Referências.

REFERÊNCIAS

- 1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OCDE, Paris.
- 2) Adler, I.D. (1984), «Cytogenetic Tests in Mammals» in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.
- 3) Preston, R.J. *et al.* (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, pp. 157-165.
- 4) Richold, M. *et al.* (1990), «In Vivo Cytogenetics Assays» in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.
- 5) Tice, R.R. *et al.* (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, pp. 305-312.

- 6) Adler, I.D. *et al.* (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, pp. 19-30.
 - 7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
 - 8) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.
 - 9) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.
 - 10) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.
 - 11) OCDE (2000), «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation» OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N.º19, OECD Publishing, Paris.
 - 12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, pp. 147-163.
 - 13) Lovell, D.P. *et al.* (1989), «Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays» in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
-

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Aneuploidia: desvio do número diploide (ou haploide) normal de cromossomas, cifrando-se a diferença em um ou mais cromossomas mas não em múltiplos de séries completas de cromossomas (*cf.* poliploidia).

Centrómero: região ou regiões de um cromossoma a que estão associadas fibras fusiformes durante a divisão celular, permitindo o movimento ordeiro dos cromossomas para os polos da célula.

Produto químico: substância ou mistura.

Aberração cromatídica: lesão estrutural de um cromossoma, expressa pela rutura de cromátídeos em isolado ou pela rutura de cromátídeos seguida da sua união.

Aberração cromossómica: lesão estrutural de um cromossoma, expressa pela rutura de ambos os cromátídeos no mesmo local ou pela sua rutura seguida de união.

Endorreduplicação: processo mediante o qual, após um período S de replicação do ADN, o núcleo não sofre mitose mas inicia um novo período S. O resultado são cromossomas com cromátídeos em número de 4, 8, 16, etc.

Lacuna: lesão acromática de extensão inferior à largura de um cromátídeo e com desalinhamento mínimo dos cromátídeos.

Índice mitótico: relação entre o número de células em mitose e o número total de células de uma população, que constitui uma medida do estado de proliferação dessa população celular.

Aberração numérica: alteração do número de cromossomas, relativamente ao número de cromossomas característico dos animais utilizados (aneuploidia).

Poliploidia: aberração cromossómica numérica que implica uma alteração no número de cromossomas no seu conjunto — por oposição a uma alteração numérica numa parte do conjunto dos cromossomas (*cf.* aneuploidia).

Aberração cromossomática estrutural: alteração da estrutura dos cromossomas detetável por exame microscópico das células em metáfase, na forma de supressões e fragmentos e de alterações num cromátídeo ou entre cromátídeos.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual se aplique o presente método de ensaio.

*Apêndice 2***CONCEÇÃO MULTIFATORIAL PARA IDENTIFICAR DIFERENÇAS ENTRE SEXOS NO ENSAIO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS *IN VIVO*****Conceção multifatorial e sua análise**

Este ensaio utiliza, no mínimo, 5 machos e 5 fêmeas para cada concentração, totalizando, no mínimo, 40 animais (20 machos e 20 fêmeas, além dos controlos positivos pertinentes).

O ensaio, que constitui uma das concepções multifatoriais mais simples, equivale a uma análise de variância bidirecional, em que o sexo e a concentração são os principais efeitos. Os dados podem ser analisados por vários pacotes de *software* estatístico normalizados, como SPSS, SAS, STATA e Genstat, bem como por recurso ao parâmetro R.

A análise discrimina, no conjunto de dados, a variabilidade entre os sexos, a variabilidade entre as concentrações e a variabilidade relativa à interação entre os sexos e as concentrações. Cada um dos termos é testado em função da variabilidade entre os animais replicados nos grupos do mesmo sexo, para a mesma concentração. Em muitos manuais de estatística normalizados (ver referências) e na função «ajuda» que acompanha os pacotes estatísticos, estão disponíveis dados pormenorizados sobre a metodologia em causa.

A análise consiste em confrontar o termo da interação sexo-concentração no quadro ANOVA ⁽¹⁾. Na ausência de um termo de interação significativo, os valores combinados entre os sexos ou entre as concentrações proporcionam provas estatísticas válidas entre as concentrações, com base nas que são agrupadas no termo de variabilidade dos grupos ANOVA.

A análise prossegue repartindo a estimativa da variabilidade entre as concentrações por contrastes, o que proporciona uma melhor abordagem dos contrastes lineares e quadráticos das respostas às concentrações. Quando existe uma interação significativa sexo-concentração, este termo pode igualmente ser cindido em contraste de interação linear em função do sexo e em contraste de interação quadrática em função do sexo. Ambos os termos em causa permitem definir se as respostas às concentrações são paralelas para ambos os sexos ou se existe uma resposta diferencial entre eles.

A estimativa do agrupamento no contexto da variabilidade do grupo pode ser utilizada como teste par-a-par da diferença entre as médias. As comparações podem ser efetuadas entre as médias para ambos os sexos e as médias para a concentração diferente, bem como entre as concentrações do controlo negativo. Casos exista uma interação significativa, podem efetuar-se comparações entre as médias de várias concentrações, com um só sexo, ou entre as médias dos sexos para a mesma concentração.

REFERÊNCIAS

Há muitos manuais de estatística que abordam a teoria, a concepção, a metodologia, a análise e a interpretação de abordagens fatoriais, desde a forma mais simples (bifatorial) às formas mais complexas utilizadas na metodologia de ensaio. Apresenta-se a seguir uma lista não exaustiva. Algumas publicações fornecem exemplos concretos de abordagens comparáveis, incluindo, por vezes, o código para efetuar as análises por recurso a vários pacotes de *software*.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Os estatistas que adotam uma metodologia de modelização como os modelos lineares gerais (GLM) podem abordar a análise de uma forma diferente mas comparável, independentemente do quadro ANOVA tradicional, que recorre, para os cálculos estatísticos, a abordagens algorítmicas da era pré-informática.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J. & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.»

5) Na parte B, o capítulo B.12 é substituído pelo seguinte texto:

«B.12 Ensaio de micronúcleos em eritrócitos de mamíferos

INTRODUÇÃO

Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 474 (2016) da OCDE. Faz parte de uma série de métodos de ensaio sobre toxicologia genética. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente efetuadas às orientações da OCDE nesse domínio (1).

O ensaio *in vivo* de micronúcleos em células de mamíferos é particularmente importante para a avaliação da genotoxicidade, visto que, embora possam variar de espécie para espécie, os fatores do metabolismo *in vivo*, a farmacocinética e os processos de reparação do ADN estão ativos e contribuem para as respostas. Os ensaios *in vivo* são igualmente úteis para investigação suplementar de genotoxicidade detetada *in vitro*.

O ensaio *in vivo* de micronúcleos em células de mamíferos é utilizado na deteção de danos induzidos pelo produto químico em estudo nos cromossomas ou no aparelho mitótico dos eritroblastos, através da avaliação da formação de micronúcleos em eritrócitos colhidos na medula óssea ou provenientes de células de sangue periférico de animais, geralmente roedores.

O objetivo do ensaio de micronúcleos é identificar produtos químicos que causem danos citogenéticos indutores da formação de micronúcleos que contenham cromossomas inteiros ou fragmentos de cromossoma retardatários.

Quando um eritroblasto de medula óssea evolui para um eritrócito imaturo (também designado por «eritrócito policromático» ou «reticulócito»), o núcleo principal é expulso, mas os micronúcleos eventualmente já formados podem permanecer no citoplasma. A visualização ou deteção dos micronúcleos nestas células é facilitada pela ausência de núcleo principal. Um aumento da frequência de eritrócitos imaturos micronucleados nos animais expostos ao produto químico em estudo constitui uma indicação de aberrações cromossómicas estruturais, ou numéricas, induzidas.

Identificam-se e quantificam-se os eritrócitos micronucleados recém-formados por coloração, seguida de contagem visual ao microscópio ou análise automática. O recurso a meios de contagem automática facilita grandemente a contagem de um número suficiente de eritrócitos imaturos no sangue periférico ou na medula óssea de animais adultos. O recurso a meios automáticos constitui uma alternativa aceitável à avaliação não-automática (2). Os estudos comparativos realizados revelaram que os métodos automáticos, associados à utilização de padrões de calibração adequados, podem proporcionar melhores sensibilidade, reprodutibilidade interlaboratorial e reprodutibilidade intralaboratorial do que a contagem não-automática ao microscópio (3) (4). Entre os sistemas automáticos que podem medir frequências de eritrócitos micronucleados contam-se os citómetros de fluxo (5), analisadores de imagem (6) (7) e citómetros de varrimento por laser (8).

Embora isso não faça normalmente parte do ensaio, vários critérios permitem distinguir entre fragmentos de cromossoma e cromossomas inteiros. É o caso da identificação da presença ou ausência de cinetócoro ou de ADN centromérico, ambos característicos dos cromossomas intactos. A ausência de cinetócoro ou de ADN centromérico indica que o micronúcleo contém apenas fragmentos de cromossomas; a presença de algum deles indica perda cromossómica.

O apêndice 1 estabelece definições da terminologia utilizada.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Uma vez que os eritrócitos são produzidos na medula óssea, o tecido-alvo dos danos genéticos avaliados neste ensaio é medula óssea de roedores adultos jovens. Desde que se apresentem razões científicas para isso, pode igualmente realizar-se a contagem de micronúcleos em eritrócitos imaturos de sangue periférico de outras espécies de mamíferos, cuja sensibilidade na deteção de produtos químicos causadores de aberrações cromossómicas estruturais ou numéricas tenha sido demonstrado ser adequada (por indução de micronúcleos em eritrócitos imaturos). A frequência dos eritrócitos imaturos micronucleados é o parâmetro principal. Se os animais forem expostos ao produto químico em estudo de forma contínua durante um período superior ao tempo de vida dos eritrócitos da espécie em causa (por exemplo, no caso do rato, quatro ou mais semanas), a frequência de eritrócitos maduros micronucleados no sangue periférico pode igualmente utilizar-se como parâmetro em espécies sem grande seleção esplénica contra células micronucleadas.

Se houver provas de que nem o produto ou os produtos químicos em estudo nem nenhum dos seus metabolitos entram em contacto com o tecido-alvo, o presente ensaio pode não ser adequado.

Antes da aplicação deste método de ensaio a uma mistura para obter dados relacionados com exigências normativas, importa ponderar se — e, em caso afirmativo, por que motivo — o método pode fornecer resultados adequados para o efeito. Essa ponderação não é necessária se exigências normativas impuserem o ensaio da mistura em causa.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Expõem-se os animais ao produto químico em estudo, por uma via adequada. Se for utilizada medula óssea, eutanásiam-se os animais transcorrido(s) o(s) período(s) adequado(s) após a exposição e extrai-se-lhes medula; em seguida, realizam-se as preparações e procede-se à sua coloração (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Se for utilizado sangue periférico, colhe-se o sangue uma vez transcorrido(s) o(s) período(s) adequado(s) após a exposição; em seguida, realizam-se as preparações e procede-se à sua coloração (12) (16) (17) (18). Se a administração do produto químico for rápida, é importante colher o sangue ou a medula óssea depois de transcorrido um período suficiente para possibilitar a deteção de eritrócitos imaturos com micronucleação induzida pela exposição. Se forem colhidas amostras de sangue periférico, é necessário que tenha passado um período suficiente para que os efeitos se manifestem na circulação sanguínea. Pesquisam-se os micronúcleos nas preparações por exame ao microscópio, análise de imagem, citometria de fluxo ou citometria de varrimento por laser.

VERIFICAÇÃO DA COMPETÊNCIA TÉCNICA DO LABORATÓRIO

Determinação da competência técnica

A fim de comprovar que possui experiência suficiente na realização do ensaio antes de passar a utilizar este método em ensaios de rotina, o laboratório deve ter-se demonstrado capaz de reproduzir os resultados de frequência de micronúcleos decorrentes dos dados publicados (por exemplo: (17) (19) (20) (21) (22)) com, pelo menos, dois produtos químicos de controlo positivo (incluindo respostas fracas induzidas por doses baixas desses produtos químicos), nomeadamente os constantes do quadro 1, e com amostras de controlo do excipiente/do solvente compatíveis (ver o ponto 26). Estas experiências devem utilizar doses que originem aumentos reprodutíveis e dependentes da dose e devem demonstrar a sensibilidade e a gama dinâmica do sistema de ensaio no tecido em causa (medula óssea ou sangue periférico), recorrendo ao método de contagem a utilizar no laboratório. Este requisito não é aplicável a laboratórios com experiência, isto é, que disponham de uma base de dados históricos, como se refere nos pontos 14 a 18.

Dados históricos de controlo

No decurso da determinação da competência técnica, o laboratório deve estabelecer:

- um historial da gama e da distribuição dos controlos positivos;
- um historial da gama e da distribuição dos controlos negativos.

Ao obter os primeiros dados para um historial de distribuição dos controlos negativos, os controlos negativos realizados em paralelo devem ser coerentes com os dados de controlo publicados, caso existam. À medida que se forem adicionando mais dados experimentais ao historial de distribuição dos controlos, os controlos negativos realizados em paralelo devem, idealmente, situar-se dentro dos limites de 95 % dos controlos daquela distribuição. A base de dados históricos de controlo negativo do laboratório deve ter a solidez estatística necessária para que o laboratório possa avaliar a distribuição dos seus dados de controlo negativo. A bibliografia indica que podem ser necessárias, no mínimo, 10 experiências, embora, de preferência, devam ser realizadas, pelo menos, 20 experiências em condições experimentais comparáveis. Os laboratórios devem utilizar métodos de controlo de qualidade, como gráficos de controlo (por exemplo: gráficos C ou gráficos de barras (23)), para identificar a variabilidade dos seus dados e demonstrar que o laboratório domina a metodologia. Encontram-se na bibliografia (24) outras recomendações sobre a forma de obter e utilizar dados históricos (critérios de inclusão e exclusão de dados em séries históricas e critérios de aceitação das experiências realizadas).

Se o laboratório não realizar um número suficiente de experiências para estabelecer uma distribuição estatisticamente sólida dos controlos negativos (ver o ponto 15) durante a determinação da competência técnica (ponto 13), é aceitável que a distribuição possa ser completada nos primeiros ensaios de rotina. Este procedimento deve seguir as recomendações enunciadas na bibliografia (24); os resultados de controlo negativo obtidos nas referidas experiências devem ser coerentes com os dados de controlo negativo publicados.

As eventuais alterações ao protocolo experimental devem ser ponderadas em função da manutenção da coerência dos dados delas resultantes com a base de dados históricos de controlo do laboratório. Apenas grandes incoerências justificam a constituição de uma nova base de dados históricos de controlo, caso um parecer de perito considere que a nova distribuição diferirá da anterior (ver o ponto 15). Durante a constituição da nova base, pode não ser necessário dispor de uma base de dados de controlo negativo completa para realizar ensaios reais, desde que o laboratório possa demonstrar que os valores de controlo negativo obtidos em paralelo são coerentes com a sua base de dados anterior ou com os dados publicados correspondentes.

Os dados de controlo negativo devem ser constituídos pela incidência de eritrócitos imaturos micronucleados em cada animal. Os controlos negativos realizados em paralelo devem, idealmente, situar-se dentro dos limites de 95 % dos controlos da distribuição da base de dados históricos de controlo negativo do laboratório. Caso se situem fora desses limites, os dados de controlos negativos realizados em paralelo podem ser aceitáveis para inclusão no historial de distribuição de controlos se não forem valores aberrantes extremos, se o sistema de ensaio estiver comprovadamente dominado (ver o ponto 15) e se não houver indícios de erro humano ou de deficiência técnica.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparativos

Escolha da espécie animal

Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis, das estirpes de laboratório mais comuns. Podem ser utilizados ratos, ratazanas ou qualquer outra espécie de mamífero adequada. Caso se utilize sangue periférico, deve comprovar-se que a eliminação, pelo baço, de células micronucleadas em circulação não compromete a deteção de micronúcleos induzidos na espécie escolhida, o que foi claramente demonstrado em relação ao sangue periférico dos ratos e ratazanas (2). Deve constar do relatório a justificação científica da utilização de uma espécie que não seja o rato ou a ratazana. Se forem utilizadas espécies que não sejam roedores, recomenda-se que a medição dos micronúcleos induzidos seja integrada noutra ensaio de toxicidade adequado.

Condições de alojamento e de alimentação dos animais

No caso dos roedores, a temperatura do biotério deve ser de 22 °C (± 3 °C). Idealmente, a humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 40 %, 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 alternância de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Para a alimentação, podem ser usadas dietas convencionais de laboratório, com acesso ilimitado a água potável. Quando o produto químico em estudo for administrado por via alimentar, a escolha da dieta pode ser condicionada pela necessidade de assegurar uma incorporação adequada. Os roedores devem ser alojados em pequenos grupos (não mais de cinco por gaiola) do mesmo sexo e grupo de exposição — caso não se prevejam comportamentos agressivos —, de preferência em gaiolas com pavimento contínuo e enriquecimento ambiental adequado, embora possam ser alojados individualmente se houver razões científicas que o justifiquem.

Preparação dos animais

Normalmente utilizam-se animais adultos, jovens e saudáveis (no caso dos roedores, idealmente com 6-10 semanas no início da exposição, embora sejam aceitáveis animais ligeiramente mais velhos), que se distribuem aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos de exposição. Identificam-se os animais de forma unívoca, utilizando um método que não cause sofrimento e seja o menos invasivo possível (por exemplo: anilhas, marcações, *microchips* ou identificação biométrica, mas não entalhe de orelhas nem amputação de falanges), e aclimatam-se às condições do laboratório durante, pelo menos, cinco dias. As gaiolas devem estar dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Devem ser evitadas contaminações cruzadas pelo produto químico de controlo positivo e pelo produto químico em estudo. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima e não deve exceder ± 20 % do peso médio de cada sexo.

Preparação das doses

Os produtos químicos em estudo que se apresentem no estado sólido devem ser dissolvidos ou suspensos em solventes ou excipientes adequados, ou misturados na dieta ou na água de beber, antes da administração aos animais. Os produtos químicos em estudo que se apresentem no estado líquido podem ser administrados diretamente ou ser diluídos antes da administração. No caso de exposições por inalação, os produtos químicos em estudo podem ser administrados sob a forma de gás, vapor ou aerossol sólido/líquido, em função das suas propriedades físico-químicas. Devem ser utilizadas preparações frescas do produto químico em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o mesmo pode ser armazenado e definam as condições de armazenagem adequadas.

Condições de realização do ensaio

Solvente/excipiente

O solvente/excipiente não deve produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas nem reagir quimicamente com o produto químico em estudo. A eventual utilização de solventes/excipientes menos habituais deve ser fundamentada por dados de referência que indiquem serem compatíveis. Recomenda-se, sempre que possível, a utilização prioritária de solventes/excipientes aquosos. A água, o soro fisiológico, uma solução de metilcelulose, uma solução de sal de sódio de carboximetilcelulose, o azeite e o óleo de milho constituem exemplos de solventes/excipientes compatíveis de utilização comum. Na ausência de dados de controlo, históricos ou publicados, demonstrativos de que o solvente/excipiente inabitual eventualmente escolhido não induz a formação de micronúcleos nem outros efeitos deletérios, deve realizar-se um ensaio preliminar que permita tirar conclusões sobre a aceitabilidade do controlo do solvente/excipiente utilizado.

Controlos

Controlos positivos

Como regra geral, deve incluir-se em cada ensaio um grupo de animais expostos a um produto químico de controlo positivo. Este princípio pode não ser seguido caso o laboratório de ensaio se tenha demonstrado competente na realização do ensaio e tenha estabelecido um gama histórica de controlo positivo. Se não se incluir um grupo de controlo positivo paralelo, cada ensaio deve compreender controlos de contagem (lâminas fixadas e não-coradas ou amostras de suspensões celulares, conforme o método de contagem utilizado). Para o efeito, podem incluir-se na contagem realizada no estudo amostras de referência adequadas, provenientes de experiências de controlo positivo efetuadas separadamente a intervalos regulares (por exemplo todos os 6 a 18 meses) e armazenadas em seguida — por exemplo obtidas nos ensaios de demonstração de competência técnica e, subsequentemente, com a regularidade necessária.

Os produtos químicos de controlo positivo devem gerar, com fiabilidade, um aumento detetável da frequência de formação de micronúcleos, em relação ao nível de ocorrência espontâneo. Quando se recorre a microscopia para efetuar uma contagem não-automática, a dose de controlo positivo a administrar deve ser escolhida de modo a evidenciar efeitos claros, mas não imediatamente reveladores da identidade das amostras codificadas à pessoa que efetua as contagens. É aceitável administrar o controlo positivo por via diferente da utilizada para o produto químico em estudo, seguir um programa de exposição diferente e colher amostras uma única vez. Quando se justifique, pode ainda ponderar-se a utilização de produtos químicos de controlo positivo da mesma classe química. O quadro 1 apresenta exemplos de produtos químicos de controlo positivo.

Quadro 1

Exemplos de produtos químicos de controlo positivo.

Produto químico e n.º de registo CAS
Metanossulfonato de etilo [62-50-0]
Metanossulfonato de metilo [66-27-3]
Etilnitrosoureia [759-73-9]
Mitomicina C [50-07-7]
Ciclofosfamida (mono-hidratada) [50-18-0 (6055-19-2)]
Trietilenomelamina [51-18-3]
Colquicina [64-86-8] ou vimblastina [865-21-4] — como aneugénios

Controlos negativos

A todos os tempos de colheita de amostras deve estar associado um grupo de animais de controlo negativo, tratados da mesma forma que os animais dos grupos expostos, exceto não serem expostos ao produto químico em estudo. Se for utilizado um solvente/excipientes para administrar o produto químico em estudo, o grupo de controlo deve recebê-lo também. No entanto, se os dados históricos de controlo negativo do laboratório de ensaio demonstrarem, para cada tempo de colheita de amostras, coerência na variabilidade entre animais e na frequência de células com micronúcleos, pode ser suficiente uma única amostragem de controlo negativo. Em caso de recurso a uma única amostragem de controlo negativo, esta deve corresponder ao primeiro tempo de colheita de amostras utilizado no estudo.

Se for utilizado sangue periférico e o estudo for de curta duração, uma amostra colhida antes da exposição pode fazer as vezes de amostra de controlo negativo ensaiada em paralelo, desde que os dados daí resultantes sejam coerentes com a base de dados históricos de controlo do laboratório de ensaio. Foi demonstrado na ratazana que a colheita de pequenos volumes (por exemplo menos de 100 µl/dia) de amostras antes da exposição tem incidência mínima na frequência de fundo da formação de micronúcleos (25)

PROTOCOLO DE ENSAIO

Número e sexo dos animais

Em geral, a resposta dos animais, em termos de formação de micronúcleos em machos e fêmeas, é semelhante, pelo que a maioria dos estudos pode ser realizada em qualquer dos sexos (26). Dados reveladores de diferenças significativas entre machos e fêmeas (por exemplo: diferenças de toxicidade sistémica, de metabolismo, de biodisponibilidade, de toxicidade para a medula óssea etc., designadamente em estudos exploratórios de gamas de dosagem) aconselham a utilização de ambos os sexos. Neste caso, pode justificar-se o estudo em ambos os sexos: por exemplo no contexto de um estudo de toxicidade com repetição da dose. Caso se utilizem animais de ambos os sexos, pode justificar-se o recurso ao modelo fatorial. O apêndice 2 explica como analisar os dados por recurso a este modelo.

A dimensão dos grupos no início do estudo deve permitir dispor de um mínimo de 5 animais analisáveis do mesmo sexo por grupo ou, se forem utilizados ambos os sexos, de um mínimo de 5 animais analisáveis de cada sexo por grupo. Nos casos em que a exposição humana ao produto químico possa ser específica de um dos sexos, como acontece com alguns produtos farmacêuticos, o ensaio deve ser executado com animais do sexo em causa. A título de orientação, o número máximo de animais necessário num estudo em medula óssea realizado de acordo com os parâmetros estabelecidos no ponto 37, com três grupos de dosagem e, em paralelo, um grupo de controlo negativo e um grupo de controlo positivo (cada um deles constituído por cinco animais do mesmo sexo), será normalmente de 25 a 35.

Níveis de dosagem

Se, por não estarem disponíveis dados que possam servir de orientação na escolha das doses, se realizar previamente um estudo exploratório da gama de dosagens a administrar, este deve ter lugar no mesmo laboratório, utilizando a mesma espécie, a mesma estirpe, o mesmo sexo e o mesmo regime de exposição previstos para o estudo principal (27). Este estudo deve procurar identificar a dose máxima tolerável (DMT), definida como a dose mais elevada que será tolerada sem gerar sinais de toxicidade limitativos do estudo, atendendo à duração do mesmo (por exemplo: que induza quebras do peso corporal ou citotoxicidade no sistema hematopoiético, mas que não cause morte nem sinais de dor, sofrimento ou tensão que obriguem a eutanasiar os animais (28)).

A dose máxima pode igualmente ser definida como a dose que gera toxicidade na medula óssea (por exemplo: redução de mais de 50 % da proporção de eritrócitos imaturos no total de eritrócitos da medula óssea ou do sangue periférico, mas sem que essa proporção se reduza a menos de 20 % do valor correspondente ao grupo de controlo). Todavia, quando se analisam células com reação positiva à CD71 na circulação sanguínea periférica (por citometria de fluxo), esta fração de eritrócitos imaturos muito jovens responde a ações tóxicas mais rapidamente do que o grupo, mais numeroso, de eritrócitos imaturos com reação positiva ao ARN. Por conseguinte, nas experiências que, após exposição aguda, examinem a fração de eritrócitos imaturos com reação positiva à CD71, a toxicidade pode parecer superior à revelada em experiências que identifiquem os eritrócitos imaturos com base no teor de ARN. Por este motivo, nas experiências que prevejam cinco ou menos dias de exposição, pode definir-se o nível máximo de dosagem de um produto químico tóxico como a dose que provoca uma redução com significância estatística da proporção de eritrócitos imaturos com reação positiva à CD71 no total de eritrócitos, mas sem que essa proporção se reduza a menos de 5 % do valor correspondente ao grupo de controlo (29).

Os produtos químicos cujas propriedades toxicocinéticas atinjam a saturação ou que induzam processos de desintoxicação passíveis de se traduzirem numa diminuição da exposição após administração prolongada podem constituir exceção aos critérios de fixação das doses, devendo ser avaliados caso a caso.

Um estudo completo que vise obter informação sobre a resposta às doses deve incluir um grupo de controlo negativo e, no mínimo, três níveis de dosagem, espaçados por um fator que, em geral, é 2 e não pode ser superior a 4. Se o produto químico em estudo não gerar toxicidade num estudo exploratório da gama de dosagens ou os dados disponíveis o comprovarem, a dose mais elevada deve ser de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia, para períodos de administração de 14 ou mais dias, ou de 2 000 mg/kg de peso corporal/dia, para períodos de administração de menos de 14 dias. Se o produto químico em estudo gerar toxicidade, a dose máxima administrada deve ser a DMT e as doses utilizadas devem, de preferência, abranger uma gama compreendida entre a dose máxima e uma dose de toxicidade baixa ou nula. Caso se observe toxicidade no tecido-alvo (medula óssea) a todas as doses ensaiadas, recomenda-se a realização de um estudo complementar com doses não-tóxicas. Os estudos destinados a obter informações quantitativas dose-resposta mais precisas podem necessitar de mais grupos de dosagem. Os limites indicados podem variar no caso do estudo de certos tipos de produtos químicos (por exemplo medicamentos para uso humano) abrangidos por exigências específicas.

Ensaio do limite

Se os estudos exploratórios da gama de dosagens ou dados existentes relativos a estirpes animais afins indicarem que um regime de exposição, pelo menos, à dose-limite (abaixo indicada) não gera efeitos tóxicos observáveis (nomeadamente inibição de proliferação na medula óssea ou outros sinais de citotoxicidade no tecido-alvo) e, com base em estudos de genotoxicidade *in vitro* ou em dados referentes a produtos químicos estruturalmente afins, não for de prever a ocorrência de genotoxicidade, pode não ser necessário um estudo completo com três níveis de dosagem, desde que tenha sido demonstrado que o(s) produto(s) químico(s) em estudo atinge(m) o tecido-alvo (medula óssea). Nesses casos, pode ser suficiente um nível de dosagem único, correspondente à dose-limite. Se a administração se prolongar por 14 dias ou mais, a dose-limite é de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia. Se o período de administração for inferior a 14 dias, a dose-limite é de 2 000 mg/kg de peso corporal/dia.

Administração das doses

Na conceção do ensaio, deve ter-se em conta a via prevista de exposição humana. Por conseguinte, desde que devidamente justificadas, podem escolher-se vias de exposição como a alimentação, a água de beber, as vias tópica, subcutânea ou intravenosa, a via oral (por sonda gástrica), a via inalatória ou a via intratraqueal, ou o recurso a implantes. A via escolhida deve garantir a exposição adequada do(s) tecido(s)-alvo. A injeção intraperitoneal não é, em geral, recomendada, uma vez que não se trata de uma via previsível de exposição humana, só devendo utilizar-se com justificação científica específica. Se o produto químico em estudo for misturado nos alimentos ou na água de beber, especialmente no caso de uma dose única, deve ter-se o cuidado de prever, entre o consumo dos alimentos e da água e a colheita de amostras, um intervalo suficiente para permitir a deteção dos efeitos (ver o ponto 37). O volume máximo de líquido que se pode administrar de cada vez por sonda gástrica ou injeção depende do tamanho do animal, não devendo normalmente exceder 1 ml/100 g de peso corporal; excetuam-se as soluções aquosas, que podem ser administradas na proporção de 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes superiores carece de justificação. Exceto no caso de produtos químicos irritantes ou corrosivos, que normalmente produziram efeitos exacerbados a concentrações superiores, a variabilidade do volume de ensaio deve ser minimizada ajustando a concentração, de modo a garantir a administração de um volume constante relativamente à massa corporal, a todos os níveis de dosagem.

Programa de exposição

De preferência, realizam-se duas ou mais exposições, intervaladas de 24 horas, sobretudo quando o ensaio se integra noutros estudos de toxicidade. Em alternativa, caso haja razões científicas para isso (por exemplo no caso dos produtos químicos que reconhecidamente bloqueiam o ciclo celular), pode efetuar-se uma exposição única. Para facilitar a administração de grandes volumes, os produtos químicos em estudo também podem ser administrados sob a forma de uma dose dividida (ou seja, duas ou mais exposições no mesmo dia, separadas por não mais de 2 a 3 horas). Nesses casos, ou no caso da administração do produto químico em estudo por inalação, a colheita das amostras deve ser programada em função do momento da última administração ou do termo da exposição.

O ensaio pode ser realizado em ratos ou ratazanas de um dos seguintes modos:

- a. Expõem-se uma única vez os animais ao produto químico em estudo. Colhem-se amostras de medula óssea pelo menos duas vezes (em grupos de animais independentes), a primeira das quais pelo menos 24 horas, mas não mais de 48 horas, após a exposição, respeitando um intervalo adequado (ou intervalos adequados) entre as colheitas, a menos que o produto químico em estudo tenha reconhecidamente uma meia-vida excepcionalmente longa. Uma eventual colheita de amostras menos de 24 horas após a exposição carece de justificação. Colhem-se amostras de sangue periférico pelo menos duas vezes (no mesmo grupo de animais), a primeira das quais pelo menos 36 horas, mas não mais de 72 horas, após a exposição, respeitando um intervalo adequado (ou intervalos adequados) entre as colheitas. A primeira colheita de amostras para análise deve abranger todos os grupos de dosagem; contudo, as colheitas posteriores de amostras só têm de incidir na dosagem mais elevada. Quando se detetar uma resposta positiva numa determinada colheita, não será preciso voltar a efetuar colheitas de amostras, a menos que seja necessário obter informações quantitativas dose-resposta. Os tempos, acima referidos, a respeitar até às colheitas de amostras decorrem da cinética de aparecimento e desaparecimento dos micronúcleos nos dois tipos de tecidos.
- b. Caso se realizem duas exposições em dias sucessivos (por exemplo duas exposições intervaladas de 24 horas), devem ser colhidas amostras, uma vez, 18 a 24 horas após a exposição final, no caso da medula óssea, ou, uma vez, 36 a 48 horas após a exposição final, no caso do sangue periférico (30). Estes tempos a respeitar até às colheitas de amostras decorrem da cinética de aparecimento e desaparecimento dos micronúcleos nestes dois tipos de tecidos.
- c. Caso se realizem três ou mais exposições em dias sucessivos (por exemplo três ou mais exposições intervaladas de aproximadamente 24 horas), as amostras devem ser colhidas não mais de 24 horas após a última exposição, no caso da medula óssea, e não mais de 40 horas após a última exposição, no caso do sangue periférico (31). Esta programação de exposição permite combinar o ensaio dos cometas (colheita das amostras 2 a 6 horas após a última exposição, por exemplo) com o ensaio dos micronúcleos e integrar este último em estudos de toxicidade com repetição da dose. Segundo os dados disponíveis, após 3 ou mais administrações é observável indução da formação de micronúcleos nestes períodos mais amplos (15).

Se necessário e cientificamente justificado, e para facilitar a combinação com outros ensaios de toxicidade, podem ser adotados outros regimes de dosagem ou de colheita de amostras.

Exames

Os animais em estudo devem ser sujeitos a exames clínicos gerais, registando-se os sinais clínicos detetados, pelo menos uma vez por dia, de preferência à(s) mesma(s) hora(s) todos os dias e tendo em consideração o período de pico dos efeitos previstos após a exposição. Pelo menos duas vezes por dia, durante o período de exposição, verificam-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais. Todos os animais devem ser pesados no início do estudo, pelo menos uma vez por semana (em estudos com repetição da dose) e quando forem eutanasiados. Nos estudos que se prolonguem por uma semana ou mais, 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 desta deve ser medido a cada mudança de água e, pelo menos, uma vez por semana. Os animais com indicadores não-letais de toxicidade excessiva devem ser eutanasiados antes do termo do período de ensaio (28). Em determinados casos, pode monitorizar-se a temperatura corporal dos animais, dado que estados de hipertermia ou de hipotermia induzidos pela exposição ao produto químico em estudo podem falsear os resultados (32) (33) (34).

Exposição dos tecidos-alvo

Sempre que isso se justifique e nos casos em que não haja outros dados de exposição (ver o ponto 48), deve colher-se uma amostra de sangue num ou mais momentos oportunos, para se poderem determinar os níveis dos produtos químicos em estudo no plasma e assim comprovar que ocorreu exposição da medula óssea.

Preparação da medula óssea/do sangue

As células da medula óssea são normalmente colhidas nos fémures ou nas tíbias dos animais imediatamente após a eutanásia. Geralmente, colhem-se, preparam-se e coram-se as células por métodos bem definidos. Para se obterem pequenos volumes de sangue periférico respeitando as normas aplicáveis de bem-estar animal, pode recorrer-se a um método que permita a sobrevivência do animal, como a colheita na veia caudal ou noutra vaso sanguíneo adequado, ou optar-se por realizar a colheita num vaso principal ou por punção cardíaca, depois de eutanasiar o animal. Tanto no caso dos eritrócitos provenientes de medula óssea como no caso dos eritrócitos provenientes de sangue periférico, e conforme o método de análise utilizado, pode efetuar-se imediatamente uma coloração supravital das células (16) (17) (18), proceder-se à preparação de esfregaços das mesmas, que são em seguida corados para análise microscópica, ou optar-se por fixar e corar as células de modo adequado a uma análise por citometria de fluxo. A utilização de um corante específico do ADN — por exemplo: laranja de acridina (35) ou uma combinação do corante 33258 da Hoechst e de pironina-Y (36) — pode eliminar alguns erros associados à utilização de corantes inespecíficos do ADN. Esta vantagem não exclui a utilização de corantes convencionais (por exemplo o Giemsa para análise microscópica). Podem igualmente ser utilizados outros sistemas — por exemplo colunas de celulose para remoção das células nucleadas (37) (38) —, desde que comprovadamente compatíveis com a preparação laboratorial das amostras.

Caso sejam aplicáveis, podem ser utilizados anticorpos anticinetócoro (39), o método FISH com sondas de ADN pancentromérico (40) ou a marcação *in situ* com iniciadores pancentroméricos específicos, em combinação com uma coloração de contraste adequada do ADN (41), para identificar a natureza dos micronúcleos (cromossomas inteiros ou fragmentos de cromossomas), a fim de determinar se o mecanismo indutor da formação de micronúcleos resulta de atividade clastogénica e/ou aneugénica. Na diferenciação entre clastogénios e aneugénios, podem ser utilizados outros métodos, cuja eficácia tenha sido demonstrada.

Análise (automática e não-automática)

Todas as lâminas ou amostras a analisar, incluindo as dos grupos de controlo positivo e negativo, devem ser codificadas individualmente e de forma aleatória antes de qualquer análise, para que a pessoa que efetua as contagens não fique a par dos níveis de exposição. Essa codificação é desnecessária quando se utilizam sistemas de contagem automáticos, que não se baseiam num exame visual, influenciável pelo operador. Determina-se a proporção de eritrócitos imaturos no total de eritrócitos (imaturos + maturados) para cada animal através da contagem de, pelo menos, 500 eritrócitos, no caso da medula óssea, ou 2 000 eritrócitos, no caso do sangue periférico (42). A incidência de eritrócitos imaturos micronucleados deve ser determinada examinando, pelo menos, 4 000 eritrócitos imaturos por animal (43). Se a base de dados históricos de controlo negativo do laboratório indicar que a frequência média de fundo de eritrócitos imaturos micronucleados é inferior a 0,1 %, deve ponderar-se o exame de células adicionais. Nas amostras analisadas, a proporção de eritrócitos imaturos no total de eritrócitos, nos animais expostos, não deve ser inferior a 20 % da proporção verificada no grupo de controlo do excipiente/solvente, numa contagem ao microscópio, nem inferior a aproximadamente 5 % da proporção verificada no grupo de controlo do excipiente/solvente, numa contagem por métodos citométricos dos eritrócitos imaturos com reação positiva à CD71 (ver o ponto 31) (29). Por exemplo, no caso de um ensaio de medula óssea com contagem por microscopia, se a proporção de eritrócitos imaturos na medula óssea do grupo de controlo for de 50 %, o limite superior de toxicidade será de 10 % de eritrócitos imaturos.

Dado que o baço da ratazana retém e destrói os eritrócitos micronucleados, é preferível restringir a análise de eritrócitos imaturos micronucleados à fração mais jovem, para garantir uma sensibilidade elevada ao analisar sangue periférico desta espécie. Quando se recorre a métodos de análise automáticos, é possível identificar esses eritrócitos mais imaturos com base no teor elevado de ARN dos mesmos ou no elevado nível de recetores da transferrina (reação positiva à CD71) expressos à superfície dos ditos (31). Porém, a comparação direta de vários métodos de coloração revelou que podem ser obtidos resultados satisfatórios por diversos métodos, nomeadamente pela coloração clássica com laranja de acridina (3) (4).

DADOS E RELATÓRIOS**Tratamento dos resultados**

Devem ser apresentados num quadro os dados relativos a cada animal. Devem ser indicados separadamente, para cada animal examinado, o número de eritrócitos imaturos, o número de eritrócitos imaturos micronucleados e a proporção de eritrócitos imaturos no total de eritrócitos. Se se tiverem exposto ratos ao produto químico em estudo continuamente durante quatro semanas ou mais, também devem ser indicados os dados eventualmente obtidos relativamente ao número e à proporção de eritrócitos maduros micronucleados. Devem também ser indicados dados relativos à toxicidade revelada nos animais e aos sinais clínicos neles evidenciados.

CrITÉRIOS de aceitabilidade

CrITÉRIOS para determinar a aceitabilidade do ensaio:

- a. Os dados relativos ao grupo de controlo negativo ensaiado em paralelo são considerados aceitáveis para inclusão na base de dados históricos de controlo do laboratório (ver os pontos 15 a 18);
- b. Os grupos de controlo positivo ou de controlo de contagem ensaiados em paralelo induzem respostas compatíveis com as incluídas na base de dados históricos de controlo positivo e geram um aumento com significância estatística relativamente ao grupo de controlo negativo ensaiado em paralelo (ver os pontos 24 a 25);
- c. Foi analisado um número adequado de doses e de células;
- d. Os critérios de seleção da dose mais elevada são coerentes com os descritos nos pontos 30 a 33.

Avaliação e interpretação dos resultados

Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo se:

- a. Pelo menos um dos grupos de exposição apresentar aumento, com significância estatística, da frequência de eritrócitos imaturos micronucleados, em relação ao grupo de controlo negativo ensaiado em paralelo;
- b. Esse aumento, avaliado por recurso a uma análise de tendências adequada, for dependente da dose no período correspondente a, pelo menos, um dos tempos de colheita de amostras; e
- c. Nenhum destes resultados estiver fora da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (por exemplo limites de 95 % dos controlos, com base numa distribuição de Poisson).

Se, ao se colherem amostras uma vez transcorrido um período determinado para o efeito, apenas se examinar a dose mais elevada, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo caso se verifique aumento, com significância estatística, em relação ao grupo de controlo negativo ensaiado em paralelo e os resultados correspondentes se situem fora da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (por exemplo: limites de 95 % dos controlos, com base numa distribuição de Poisson). As referências bibliográficas (44) (45) (46) (47) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados. Quando se estuda a resposta à dosagem, devem ser analisados, pelo menos, três grupos expostos a doses diferentes do produto químico em estudo. A unidade experimental dos testes estatísticos deve ser o animal. Um resultado positivo no ensaio de micronúcleos indica que o produto químico em estudo induz a formação de micronúcleos, como resultado de danos provocados nos cromossomas ou no aparelho mitótico dos eritroblastos da espécie ensaiada. Caso se tenha realizado um ensaio de deteção de centrómeros em micronúcleos, considerar-se-ão aneugénicos os produtos químicos que produzam micronúcleos com centrómeros (deteção de ADN centromérico ou de cinetócoro, indicativos de perda cromossómica total).

Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo se, em todas as condições experimentais examinadas:

- a. Nenhum dos grupos de exposição apresentar aumento, com significância estatística, da frequência de eritrócitos imaturos micronucleados, em relação ao grupo de controlo negativo ensaiado em paralelo;

- b. Não se observar nenhum aumento dependente da dose, numa avaliação feita com base numa análise de tendências adequada, para nenhum tempo de amostragem;
- c. Todos os resultados se situarem dentro da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (por exemplo: limites de 95 % dos controlos, com base numa distribuição de Poisson); e
- d. A medula óssea tiver sido exposta ao(s) produto(s) químico(s) em estudo.

As referências bibliográficas (44) (45) (46) (47) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados. A exposição da medula óssea ao produto químico em estudo pode ser comprovada por uma redução da razão entre os eritrócitos imaturos e os eritrócitos maduros ou por medição dos níveis do produto químico em estudo no plasma ou no sangue. No caso da administração intravenosa, não são necessárias provas da exposição. Em alternativa, para demonstrar a exposição da medula óssea, pode recorrer-se a dados de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) obtidos num estudo independente, pela mesma via e na mesma espécie. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, o produto químico em estudo não induz a formação de micronúcleos em eritrócitos imaturos da espécie ensaiada.

As respostas inequivocamente positivas ou inequivocamente negativas não carecem de confirmação.

No caso de a resposta não ser inequivocamente negativa nem inequivocamente positiva, para se tirarem conclusões sobre a importância biológica de um resultado (por exemplo um aumento ténue ou no limite), os dados devem ser avaliados por peritos e/ou as experiências realizadas devem ser objeto de estudos complementares. Em alguns casos, pode ser útil analisar mais células ou repetir o ensaio, alterando as condições experimentais.

Em certos casos, raros, mesmo após estudos complementares, os dados obtidos não permitirão concluir por um resultado positivo ou negativo do ensaio do produto químico, pelo que se considerará que o resultado do estudo é ambíguo.

Relatório do ensaio

Elementos a constar do relatório do ensaio:

Resumo

Produto químico em estudo:

- origem, número de lote e data-limite de utilização, se forem conhecidos;
- estabilidade, se for conhecida.

Substância monocomponente:

- aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas relevantes;
- dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o número CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural, o grau de pureza, a identidade química das impurezas, se justificado e exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

- caracterização, tanto quanto possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Preparação do produto químico em estudo:

- justificação do excipiente escolhido;
- solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/excipientes, se forem conhecidas;

- preparação de fórmulas alimentares, na água de beber ou inaláveis;
- determinações analíticas realizadas (eventualmente) a essas fórmulas (por exemplo: estabilidade, homogeneidade, concentrações nominais).

Animais ensaiados:

- espécie/estirpe utilizada e justificação da utilização;
- número, idade e sexo;
- origem, condições de alojamento, dieta etc.;
- método de identificação unívoca dos animais;
- em estudos de curta duração: peso de cada animal no início e no final do ensaio; em estudos de duração superior a uma semana: peso corporal de cada animal durante o estudo e consumo de alimentos; devem incluir-se, para cada grupo, a gama de pesos corporais, com a média e o desvio-padrão respetivos.

Condições de realização do ensaio:

- dados de controlo positivo e de controlo negativo (excipiente/solvente);
- resultados do eventual estudo exploratório da gama de dosagem;
- fundamentação da escolha das doses;
- elementos relativos à preparação do produto químico em estudo;
- elementos relativos à administração do produto químico em estudo;
- fundamentação da via e do período de administração;
- métodos para verificar se os produtos químicos em estudo entraram na circulação geral ou atingiram o tecido-alvo;
- dose real (mg/kg de peso corporal/dia), calculada a partir da concentração do produto químico em estudo nos alimentos/na água de beber (ppm) e do consumo de alimentos/de água de beber, se aplicável;
- elementos relativos à qualidade dos alimentos e da água;
- método de eutanásia;
- eventual método de analgesia;
- descrição detalhada da exposição e do programa de colheita de amostras e justificação das escolhas feitas;
- métodos de preparação das lâminas;
- procedimentos para o isolamento e a conservação das amostras;
- métodos de medição da toxicidade;
- critérios de contabilização dos eritrócitos imaturos micronucleados;
- número de células analisadas por animal para determinar a frequência de eritrócitos imaturos micronucleados e a proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos maduros;
- critérios de aceitabilidade do estudo;
- métodos (como a utilização de anticorpos anticinetócoro ou de sondas específicas de ADN centromérico) para determinar se os micronúcleos contêm cromossomas inteiros ou fragmentos de cromossomas, se aplicável;

Resultados:

- estado dos animais antes e durante o período de ensaio, incluindo sinais de toxicidade;
- proporção de eritrócitos imaturos em relação ao total de eritrócitos;
- número de eritrócitos imaturos micronucleados correspondente a cada animal;
- média e desvio-padrão dos eritrócitos imaturos micronucleados correspondentes a cada grupo;
- relação dose-resposta, se possível;
- métodos estatísticos utilizados e análises estatísticas efetuadas;
- dados relativos aos grupos de controlo negativo e de controlo positivo ensaiados em paralelo, indicando os intervalos, valores médios e desvios-padrão correspondentes;
- dados históricos relativos ao controlo negativo e ao controlo positivo, indicando os intervalos, valores médios e desvios-padrão correspondentes e os limites de 95 % dos controlos da distribuição, bem como o período abrangido e o número de pontos de dados;
- dados comprovativos da exposição da medula óssea;
- dados de caracterização indicativos da presença, nos micronúcleos, de cromossomas inteiros ou de fragmentos de cromossomas, se aplicável;
- critérios de resposta positiva ou negativa cumpridos.

*Discussão dos resultados.**Conclusão.**Referências.*

REFERÊNCIAS

- 1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234. OCDE, Paris.
- 2) Hayashi, M., *et al.* (2007). *In vivo* erythrocyte micronucleus assay. III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. *Mutation Research — Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 627/1, pp. 10-30.
- 3) MacGregor, J.T., *et al.* (2006). Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat. *Toxicology Sciences*, vol. 94/1, pp. 92-107.
- 4) Dertinger, S.D., *et al.* (2006). Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring. *Toxicological Sciences*, vol. 94/1, pp. 83-91.
- 5) Dertinger, S.D., *et al.* (2011). Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage. *Mutagenesis*, vol. 26/1, pp. 139-145.
- 6) Parton, J.W., Hoffman, W.P., Garriott, M.L. (1996). Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system. *Mutation Research*, vol. 370/1, pp. 65-73.
- 7) Asano, N., *et al.* (1998). An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravital stained peripheral blood cells. *Mutation Research — Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 404/1-2, pp. 149-154.

- 8) Styles, J.A., *et al.* (2001). Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry. *Cytometry*, vol. 44/2, pp. 153-155.
- 9) Heddle, J.A. (1973). A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, *Mutation Research — Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 18/2, pp. 187-190.
- 10) Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, vol. 31/1, pp. 9-15.
- 11) Heddle, J.A., *et al.* (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research — Reviews in Genetic Toxicology*, vol. 123/1, pp. 61-118.
- 12) Mavournin, K.H., *et al.* (1990). The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research — Reviews in Genetic Toxicology*, vol. 239/1, pp. 29-80.
- 13) MacGregor, J.T., *et al.* (1983). Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice. *Developments in Toxicology Environmental Science*, vol. 11, pp. 555-558.
- 14) MacGregor, J.T., *et al.* (1987). Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research — Genetic Toxicology*, vol. 189/2, pp. 103-112.
- 15) MacGregor, J.T., *et al.* (1990). The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. *Fundamental and Applied Toxicology*, vol. 14/3, pp. 513-522.
- 16) Hayashi, M., *et al.* (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research — Genetic Toxicology*, vol. 245/4, pp. 245-249.
- 17) CSGMT/JEMS.MMS — The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study. *Mutation Research — Genetic Toxicology*, vol. 278/2-3, pp. 83-98.
- 18) CSGMT/JEMS.MMS — The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995). Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan). *Mutagenesis*, vol. 10/3, pp. 153-159.
- 19) Salamone, M.F., Mavournin, K.H. (1994). Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 23/4, pp. 239-273.
- 20) Krishna, G., Urda, G., Paulissen, J. (2000). Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. *Mutation Research — Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 453/1, pp. 45-50.
- 21) Hayes, J., *et al.* (2009). The rat bone marrow micronucleus test—study design and statistical power. *Mutagenesis*, vol. 24/5, pp. 419-424.
- 22) Wakata, A., *et al.* (1998). Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan, Mammalian Mutagenicity Study Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 32/1, pp. 84-100.
- 23) Ryan, T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. 2.^a edição. John Wiley and Sons, Nova Iorque.

- 24) Hayashi, M., *et al.* (2011). Compilation and use of genetic toxicity historical control data. *Mutation Research — Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 723/2, pp. 87-90.
- 25) Rothfuss, A., *et al.* (2011). Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. *Mutation Research — Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 723/2, pp. 108-120.
- 26) Hayashi, M., *et al.* (1994). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research — Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, vol. 312/3, pp. 293-304.
- 27) Fielder, R.J., *et al.* (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays. *Mutagenesis*, vol. 7/5, pp. 313-319.
- 28) OCDE (2000). «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation» OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS). Series on Testing and Assessment, N° 19. OECD Publishing, Paris.
- 29) LeBaron, M.J., *et al.* (2013). Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 54/3, pp. 222-228.
- 30) Higashikuni, N., Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, vol. 10/4, pp. 313-319.
- 31) Hayashi, M., *et al.* (2000). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 35/3, pp. 234-252.
- 32) Asanami, S., Shimono, K. (1997). High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow. *Mutation Research — Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 390/1-2, pp. 79-83.
- 33) Asanami, S., Shimono, K., Kaneda, S. (1998). Transient hypothermia induces micronuclei in mice. *Mutation Research — Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 413/1, pp. 7-14.
- 34) Spencer, P.J., *et al.* (2007). Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia. *Toxicological Sciences*, vol. 97/1, pp. 120-127.
- 35) Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr. (1983). An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Research Letters*, vol. 120/4, pp. 241-247.
- 36) MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Langlois, R.G. (1983). A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y. *Mutation Research*, vol. 120/4, pp. 269-275.
- 37) Romagna, F., Staniforth, C.D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation Research — Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 213/1, pp. 91-104.
- 38) Sun, J.T., Armstrong, M.J., Galloway, S.M. (1999). Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure. *Mutation Research*, vol. 439/1, pp. 121-126.
- 39) Miller, B.M., Adler, I.D. (1990). Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*. *Mutagenesis*, vol. 5/4, pp. 411-415.
- 40) Miller, B.M., *et al.* (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, vol. 6/4, pp. 297-302.

- 41) Russo, A. (2002). PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage. *American Journal of Medical Genetics*, vol. 107/2, pp. 99-104.
 - 42) Gollapudi, B.B., McFadden, L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Research*, vol. 347/2, pp. 97-99.
 - 43) OCDE (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS). Series on Testing and Assessment, No. 198. OECD Publishing, Paris.
 - 44) Richold, M., *et al.* (1990). «In Vivo Cytogenetics Assays» in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Parte I, revista. Kirkland, D. J. (editores), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.
 - 45) Lovell, D.P., *et al.* (1989). «Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays» in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Parte III. Kirkland, D.J. (editores), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
 - 46) Hayashi, M., *et al.* (1994). Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay. *Environmental Health Perspectives*, vol. 102/Suppl. 1, pp. 49-52.
 - 47) Kim, B.S., Cho, M., Kim, H.J. (2000). Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay. *Mutation Research — Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 469/2, pp. 233-241.
-

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Centrómero: Região ou regiões de um cromossoma às quais se ligam as fibras fusiformes durante a divisão celular, permitindo o movimento organizado dos cromossomas-filhos para os polos das células-filhas.

Produto químico: Substância ou mistura.

Eritroblasto: Estádio inicial do desenvolvimento dos eritrócitos, imediatamente anterior à formação do eritrócito imaturo, durante o qual a célula ainda possui um núcleo.

Cinetócoro: Estrutura proteica que se forma no centrómero das células eucarióticas, que liga o cromossoma a polímeros microtubulares do fuso mitótico durante a mitose e a meiose e que separa os cromátídeos do mesmo cromossoma durante a divisão celular.

Micronúcleo: Pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula e que se adiciona a este, formado durante a telófase da mitose ou meiose por cromossomas inteiros ou fragmentos de cromossoma retardatários.

Eritrócito normocromático ou maturo: Eritrócito totalmente maturo, que perdeu o ARN residual presente depois da enucleação e/ou outros marcadores celulares de vida curta que geralmente desaparecem a seguir à enucleação, depois da divisão final do eritroblasto.

Eritrócito policromático ou imaturo: Eritrócito recém-formado, num estágio intermédio de desenvolvimento, que é corado tanto pelo componente azul como pelo componente vermelho dos corantes sanguíneos clássicos, como o corante combinado de Wright-Giemsa, devido à presença de ARN residual na célula recém-formada. Estas células recém-formadas são praticamente idênticas aos reticulócitos, observáveis por meio de um corante vital que faz o ARN residual aglutinar-se num retículo. Atualmente, utilizam-se muitas vezes outros métodos para identificar eritrócitos recém-formados, como a coloração monocromática do ARN com corantes fluorescentes ou a marcação de marcadores superficiais de vida curta, como a CD71, com anticorpos fluorescentes. Os eritrócitos policromáticos, os reticulócitos e os eritrócitos com reação positiva à CD71 são todos eles eritrócitos imaturos, embora corresponda a cada um deles uma distribuição etária ligeiramente diferente.

Reticulócito: Eritrócito recém-formado que é corado por um corante vital que faz o ARN residual aglutinar-se num retículo característico. A distribuição etária dos reticulócitos e dos eritrócitos policromáticos é semelhante.

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

*Apêndice 2***MODELO FATORIAL PARA IDENTIFICAR DIFERENÇAS ENTRE SEXOS NO ENSAIO IN VIVO DE MICRONÚCLEOS****Modelo fatorial e sua análise**

Neste modelo são ensaiados, no mínimo, 5 machos e 5 fêmeas a cada concentração, totalizando, no mínimo, 40 animais (20 machos e 20 fêmeas, além dos controlos positivos necessários).

Este modelo, que constitui um dos modelos fatoriais mais simples, equivale a uma análise de variância bidirecional em que o sexo e a concentração são os efeitos principais. Os dados podem ser analisados por vários pacotes de *software* estatístico correntes, como o SPSS, o SAS, o STATA e o Genstat, bem como por recurso à linguagem R.

A análise discrimina, no conjunto de dados, a variabilidade entre os sexos, a variabilidade entre as concentrações e a variabilidade ligada à interação entre os sexos e as concentrações. Cada um destes termos é comparado com uma estimativa da variabilidade entre os animais replicados nos grupos do mesmo sexo expostos à mesma concentração. Em muitos manuais de estatística (ver «Referências»), bem como na função «ajuda» dos pacotes estatísticos, encontram-se disponíveis dados pormenorizados da metodologia em causa.

Analisa-se em seguida o termo da interação sexo-concentração num quadro ANOVA ⁽¹⁾. Na ausência de um termo de interação significativo, a combinação dos valores correspondentes aos sexos ou aos níveis de concentração permite realizar testes estatísticos válidos entre os níveis, com base no termo de variabilidade intragrupo combinada resultante da ANOVA.

A análise prossegue repartindo a estimativa da variabilidade entre as concentrações por contrastes, o que permite testar os contrastes lineares e quadráticos das respostas às concentrações. Quando há interação significativa sexo-concentração, este termo pode igualmente ser repartido num contraste de interação linear em função do sexo e num contraste de interação quadrática em função do sexo. Estes termos permitem verificar se as respostas às concentrações são paralelas para os dois sexos ou se a resposta difere de um sexo para o outro.

A estimativa da variabilidade intragrupo combinada pode servir para testar par-a-par diferenças entre médias. Estas comparações podem ser efetuadas entre as médias correspondentes a cada um dos sexos e entre as médias correspondentes a concentrações diferentes (comparações com os níveis dos controlos negativos, por exemplo). Caso haja interação significativa, podem efetuar-se comparações entre as médias correspondentes a várias concentrações para um dos sexos ou entre as médias dos dois sexos para a mesma concentração.

Referências

Há muitos manuais de estatística que abordam a teoria, a modelação, a metodologia, a análise e a interpretação de modelos fatoriais, que vão desde a forma mais simples (bifatorial) às formas mais complexas utilizadas na metodologia descrita em «*Design of Experiments*». Apresenta-se a seguir uma lista não-exaustiva. Algumas publicações dão exemplos concretos de modelos comparáveis, incluindo, por vezes, o código para efetuar as análises por recurso a vários pacotes de *software*.

Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. Nova Iorque, John Wiley & Sons.

Box, G.E.P., Draper, N.R. (1987). *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P., Davey, A.J.H. (2007). *Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application*. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Os estatísticos que adotem uma metodologia de modelização como a dos modelos lineares gerais (GLM) podem realizar esta análise de uma forma diferente, embora comparável, sem utilizarem necessariamente o quadro ANOVA tradicional, que recorre, para os cálculos estatísticos, a métodos algorítmicos da era pré-informática.

Montgomery, D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J, Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.»

- 6) Na parte B, é suprimido o capítulo B.15.
- 7) Na parte B, é suprimido o capítulo B.16.
- 8) Na parte B, é suprimido o capítulo B.18.
- 9) Na parte B, é suprimido o capítulo B.19.
- 10) Na parte B, é suprimido o capítulo B.20.
- 11) Na parte B, é suprimido o capítulo B.24.
- 12) Na parte B, o capítulo B.47 é substituído pelo seguinte texto:

«B.47 Método de ensaio de opacidade e permeabilidade da córnea em bovinos para identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves

INTRODUÇÃO

Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline 437* (2013) da OCDE. O método de ensaio de opacidade e permeabilidade da córnea em bovinos (*Bovine Corneal Opacity and Permeability* (BCOP)) foi avaliado em 2006 e 2012 pelo ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*), em colaboração com o ECVM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) e o JaCVAM (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*) (1) (2). A primeira avaliação incidiu na utilidade do método BCOP para a identificação de produtos químicos (substâncias e misturas) indutores de lesões oculares graves (1). A segunda avaliação incidiu na utilidade do método para a identificação de produtos químicos (substâncias e misturas) não classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves (2). A base de dados de validação do método BCOP contava com 113 substâncias e 100 misturas (2) (3). Destas avaliações e da correspondente avaliação inter pares concluiu-se que este método de ensaio identifica corretamente os produtos químicos (substâncias e misturas) indutores de lesões oculares graves (categoria 1) e os que não necessitam de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, conforme definição do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) da ONU (4) e do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CRE) ⁽¹⁾, tendo o método sido considerado cientificamente válido para ambas as finalidades. São lesões oculares graves as lesões produzidas nos tecidos oculares ou uma degradação grave da visão em consequência da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversíveis nos 21 dias após a aplicação. Os produtos químicos que induzem lesões oculares graves são classificados na categoria 1 do sistema GHS da ONU. São produtos químicos não classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves os que não preenchem os requisitos de classificação nas categorias 1 ou 2 (2A ou 2B) do sistema de classificação GHS da ONU, ou seja, os ditos de «Nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU. O presente método inclui a utilização recomendada e as limitações do método de ensaio BCOP decorrentes das avaliações realizadas. Principais diferenças entre a versão inicial de 2009 e a versão de 2013 do *Test Guideline* da OCDE (enumeração não-exaustiva): utilização do método BCOP na identificação de produtos químicos que não necessitam de ser classificados no sistema GHS da ONU (pontos 2 e 7); clarificação da aplicabilidade do método ao ensaio de álcoois, cetonas e sólidos (pontos 6 e 7) e a substâncias e misturas (ponto 8); clarificação do modo como devem ser ensaiadas as substâncias tensioativas e as misturas que contêm substâncias tensioativas (ponto 28); atualizações e clarificações relativas às amostras de controlo positivas (pontos 39 e 40); atualização dos critérios de decisão do método BCOP (ponto 47); atualização dos critérios de aceitação do estudo (ponto 48); atualização dos elementos a constar dos relatórios dos ensaios (ponto 49); atualização do apêndice 1, relativo às definições; aditamento do apêndice 2, relativo à capacidade de previsão do método BCOP em vários sistemas de classificação; atualização do apêndice 3, relativo à lista de produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica; atualização do apêndice 4, relativo aos suportes de córnea utilizados no método BCOP (ponto 1) e ao opacímetro (pontos 2 e 3).

⁽¹⁾ 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).

É geralmente aceite que, no futuro previsível, não estará disponível nenhum ensaio de irritação ocular *in vitro* único, alternativo ao ensaio ocular *in vivo* pelo método de Draize, para previsões em toda a gama de irritação que cubram as diferentes classes de produtos químicos. Porém, a combinação de vários métodos de ensaio alternativos no âmbito de uma estratégia de ensaio sequencial (por etapas) pode substituir-se ao ensaio ocular pelo método de Draize (5). A abordagem descendente (5) destina-se a ser utilizada quando, com base nas informações disponíveis, for previsível que o produto químico tenha elevado potencial irritante, ao passo que a abordagem ascendente (5) se destina a ser utilizada quando, com base nas informações disponíveis, for previsível que o produto químico não provoque irritação ocular suficiente para que seja necessário classificá-lo. O método de ensaio BCOP é um método *in vitro* que pode ser utilizado em determinadas circunstâncias, respeitadas determinadas limitações, para classificar e rotular produtos químicos em função da perigosidade ocular dos mesmos. Embora não seja considerado, por si só, uma alternativa válida ao ensaio ocular *in vivo* no coelho, o método de ensaio BCOP é recomendado como etapa inicial numa estratégia de ensaio do tipo da abordagem descendente proposta por Scott *et al.* (5) para identificar, sem necessidade de ensaios complementares, produtos químicos indutores de lesões oculares graves, isto é, produtos químicos classificáveis na categoria 1 do sistema GHS da ONU (4). O método BCOP é igualmente recomendado, no âmbito de uma estratégia como a abordagem ascendente (5), para identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, conforme definido pelo sistema GHS da ONU («nenhuma categoria» nesse sistema) (4). Todavia, se a aplicação do método BCOP a um determinado produto químico não permitir prever se este causa lesões oculares graves ou que não é necessário classificá-lo em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, o produto químico em causa terá de ser sujeito a ensaios adicionais (*in vitro* e/ou *in vivo*) para determinar a classificação definitiva.

Na descrição deste método de ensaio, pretende-se explicar o processo utilizado para avaliar o potencial de perigosidade ocular de um produto químico, medido pela capacidade deste de induzir opacidade e um aumento de permeabilidade em córneas de bovino isoladas. Medem-se os efeitos tóxicos na córnea do seguinte modo: i) redução da transmissão de luz (opacidade) e ii) aumento da passagem do corante fluoresceína de sódio (permeabilidade). Combinam-se os resultados das determinações de opacidade e de permeabilidade da córnea após exposição ao produto químico em estudo, de modo a obter a pontuação de irritação *in vitro* («*In Vitro Irritancy Score*» IVIS) correspondente, que é utilizada para classificar o nível de irritação causado pelo produto químico.

Estabelecem-se definições no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

Este método de ensaio baseia-se no protocolo do método BCOP do ICCVAM (6) (7), inicialmente elaborado a partir de informações baseadas no protocolo do Institute for *in vitro* Sciences (IIVS) e no Protocolo 124 do INVITTOX (8). Este último foi o protocolo utilizado no estudo de prevalidação efetuado em 1997-98 com o patrocínio da Comunidade Europeia. Estes dois protocolos basearam-se no método de ensaio BCOP descrito pela primeira vez por Gautheron *et al.* (9).

O método BCOP pode ser utilizado para identificar produtos químicos indutores de lesões oculares graves, na aceção do sistema GHS da ONU, ou seja, produtos químicos classificáveis na categoria 1 desse sistema (4). Quando utilizado com essa finalidade, a exatidão global do método BCOP é de 79 % (150/191), a taxa de falsos positivos é de 25 % (32/126) e a taxa de falsos negativos é de 14 % (9/65), comparativamente aos dados obtidos pelo método de ensaio ocular *in vivo* no coelho, classificados de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU (3) (ver

o apêndice 2, quadro 1). Excluindo da base de dados determinados produtos químicos de certas classes químicas (álcoois, cetonas) ou físicas (sólidos), a exatidão global do método BCOP é de 85 % (111/131), a taxa de falsos positivos é de 20 % (16/81) e a taxa de falsos negativos é de 8 % (4/50), no sistema de classificação GHS da ONU (3). A base de dados de validação do método de ensaio BCOP revela que, quando este é utilizado para identificar produtos químicos indutores de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU), o método tem insuficiências potenciais ao nível de taxas de falsos positivos elevadas no caso dos álcoois e das cetonas e de taxas de falsos negativos elevadas no caso dos sólidos (1) (2) (3). Porém, uma vez que o método BCOP não sobreavalia todos os álcoois e cetonas e que a previsão de categoria 1 do sistema GHS da ONU é correta no caso de alguns deles, não se consideram estes dois grupos funcionais orgânicos excluídos do domínio de aplicabilidade do método. Compete ao utilizador do método BCOP decidir se, no caso dos álcoois e cetonas, é aceitável que nem todos os resultados que o indiciem sejam efetivamente positivos ou se são necessários ensaios complementares no âmbito de uma abordagem baseada na ponderação da suficiência da prova. No que respeita à taxa de falsos negativos no caso dos sólidos, importa salientar que os sólidos podem gerar condições de exposição variáveis e extremas no ensaio de irritação ocular *in vivo* pelo método de Draize, que podem falsear as previsões do real potencial de irritação (10). Importa igualmente salientar que, no contexto da identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU), a nenhum dos falsos negativos identificados na base de dados de validação do ICCVAM (2) (3) esteve associada uma pontuação de irritação *in vitro* (IVIS) igual ou inferior a 3, critério utilizado para identificar os produtos químicos classificados de «nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU. Acresce que a obtenção de falsos negativos no método BCOP neste contexto não constitui aspeto crítico, porque os produtos químicos cuja pontuação de irritação *in vitro* seja superior a 3 e inferior ou igual a 55 são em seguida ensaiados por outros métodos *in vitro* adequadamente validados ou, em derradeira opção, no coelho, conforme as exigências normativas, por recurso a uma estratégia de ensaio sequencial baseada na ponderação da suficiência da prova. Atendendo a que a previsão de categoria 1 do sistema GHS da ONU pelo método BCOP é correta no caso de alguns produtos químicos sólidos, também não se considera a fase sólida excluída do domínio de aplicabilidade do método. Os investigadores podem ponderar o recurso a este método de ensaio para todos os tipos de produtos químicos, aceitando uma pontuação de irritação *in vitro* superior a 55 como indicativa de uma reação indutora de lesões oculares graves, merecedora da classificação 1 do sistema GHS da ONU sem necessidade de ensaios complementares. Porém, como referido, os resultados positivos obtidos no caso de álcoois ou cetonas devem ser interpretados com cautela, devido ao risco de não serem efetivamente positivos em todos os casos que o indiciem.

Também pode recorrer-se ao método BCOP para identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves no sistema de classificação GHS da ONU (4). Quando utilizado com essa finalidade, a exatidão global do método BCOP é de 69 % (135/196), a taxa de falsos positivos é de 69 % (61/89) e a taxa de falsos negativos é de 0 % (0/107), comparativamente aos dados obtidos pelo método de ensaio ocular *in vivo* no coelho, classificados de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU (3) (ver o apêndice 2, quadro 2). A taxa de falsos positivos obtida (produtos químicos com a classificação *in vivo* «nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU, mas com pontuação de irritação *in vitro* superior a 3 — ver o ponto 47) é bastante elevada, mas neste contexto não constitui aspeto crítico, porque os produtos químicos cuja pontuação de irritação *in vitro* seja superior a 3 e inferior ou igual a 55 são seguidamente ensaiados por outros métodos *in vitro* adequadamente validados ou, em derradeira opção, no coelho, conforme as exigências normativas, por recurso a uma estratégia de ensaio sequencial baseada na ponderação da suficiência da prova. O método BCOP não evidencia insuficiências específicas no ensaio de álcoois, cetonas e sólidos quando visa identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves («nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU) (3). Os investigadores podem ponderar o recurso a este método de ensaio para todos os tipos de produtos químicos, aceitando um resultado negativo (pontuação de irritação *in vitro* igual ou inferior a 3) como indicativo de que não é necessária nenhuma classificação («nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU). Uma vez que o método BCOP só consegue identificar corretamente 31 % dos produtos químicos que não necessitam de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, este método de ensaio não deve ser privilegiado para iniciar uma abordagem ascendente (5), caso estejam disponíveis outros métodos *in vitro* validados e aceites com sensibilidade igualmente elevada, mas maior especificidade.

A base de dados de validação do método BCOP contava com 113 substâncias e 100 misturas (2) (3). Considera-se, portanto, o método BCOP aplicável ao ensaio de substâncias e misturas.

Devido ao número considerável de produtos químicos da categoria 1 do sistema GHS da ONU subclassificados na categoria 2, 2A ou 2B do mesmo sistema e de produtos químicos de «nenhuma categoria» do sistema GHS sobreclassificados na categoria 2, 2A ou 2B desse sistema, não é recomendado o recurso ao método BCOP na identificação de produtos químicos que devam ser classificados de irritantes oculares (categoria 2 ou 2A do sistema GHS da ONU) nem de produtos químicos que devam ser classificados de irritantes oculares moderados (categoria 2B do sistema GHS da ONU) (2) (3). Nesses casos, podem ser necessários ensaios complementares por outro método, que seja adequado.

Na manipulação de olhos e córneas de bovino devem seguir-se as regras e procedimentos estabelecidos no laboratório para a manipulação de matérias de origem animal (tecidos, fluidos biológicos etc.). Recomenda-se a aplicação das precauções gerais inerentes à prática laboratorial (11).

Embora o método BCOP não tenha em conta as lesões na conjuntiva nem na íris, tem em conta os efeitos na córnea, fator principal do sistema de classificação GHS da ONU em função dos efeitos *in vivo*. A reversibilidade das lesões da córnea não pode ser avaliada *per se* pelo método BCOP, pelo que, com base em estudos oculares no coelho, foi proposta a possibilidade de se recorrer à avaliação da profundidade inicial da lesão da córnea para identificar alguns tipos de efeitos irreversíveis (12). São, porém, necessários mais estudos científicos para se compreender a ocorrência de efeitos irreversíveis não associados a lesões iniciais importantes. Finalmente, o método BCOP não permite avaliar o potencial de toxicidade sistémica associado à exposição ocular.

Este método de ensaio será atualizado periodicamente em função de novos dados e informações. Por exemplo, a histopatologia é potencialmente útil quando se necessita de uma caracterização mais completa das lesões da córnea. Conforme é referido no documento de orientações n.º 160 da OCDE (13), incentivam-se os utilizadores a preservarem as córneas e a prepararem espécimes histopatológicos que possam ser utilizados na constituição de uma base de dados e na definição de critérios de decisão utilizáveis na melhoria da exatidão deste método de ensaio.

Os laboratórios que comecem a utilizar este método de ensaio devem recorrer aos produtos químicos para demonstração de competência técnica recomendados no apêndice 3. Antes de apresentarem dados obtidos pelo método BCOP para efeitos da classificação normativa de perigosidade, os laboratórios podem recorrer aos referidos produtos químicos para demonstrar a sua competência técnica na execução deste método.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O método BCOP assenta num modelo organotípico de manutenção *in vitro* das funções fisiológicas e bioquímicas normais da córnea de bovino por um período curto. Neste método de ensaio, as lesões provocadas pelo produto químico em estudo são avaliadas por meio de medições quantitativas, respetivamente com um opacímetro e um espectrofotómetro de luz visível, das alterações de opacidade e permeabilidade da córnea. Ambas as medições são utilizadas para calcular uma IVIS, com base na qual se atribui uma categoria de classificação de perigo de irritação *in vitro*, utilizada como previsão do potencial de irritação ocular *in vivo* do produto químico em estudo (ver os critérios de decisão no ponto 48).

O método BCOP utiliza córneas isoladas retiradas de olhos de bovinos acabados de abater. Determina-se quantitativamente a opacidade da córnea medindo a quantidade de luz transmitida através desta. Determina-se quantitativamente a permeabilidade da córnea medindo a quantidade do corante fluoresceína de sódio que atravessa totalmente a córnea e é detetada no meio de ensaio da câmara posterior. Aplicam-se os produtos químicos em estudo na superfície epitelial da córnea introduzindo-os na câmara anterior do suporte de córnea. Figuram no apêndice 4 uma descrição e um diagrama de um suporte de córnea utilizado no método BCOP. Os suportes de córnea podem ser adquiridos no comércio, de origens diversas, ou podem ser construídos.

Origem e idade dos olhos de bovino e seleção da espécie animal

O gado enviado para os matadouros é normalmente abatido para consumo humano ou outras utilizações comerciais. Só podem ser utilizados na colheita de córneas para o método BCOP animais saudáveis considerados adequados para entrarem na cadeia alimentar humana. Dado que o peso dos bovinos é muito variável, consoante a raça, a idade e o sexo, não se recomenda qualquer peso em concreto do animal no momento do abate.

As córneas podem apresentar variações dimensionais, devido à utilização de olhos de animais de idades diversas. As córneas de bovinos com mais de oito anos têm geralmente um eixo horizontal superior a 30,5 mm e espessura central (CCT) $\geq 1\,100\ \mu\text{m}$; as de bovinos com menos de cinco anos têm geralmente um eixo horizontal inferior a 28,5 mm e CCT $< 900\ \mu\text{m}$ (14). Por essa razão, não se utilizam habitualmente olhos de bovinos com mais de 60 meses. Normalmente, também não se utilizam olhos de bovinos com menos de doze meses, dado que os olhos se encontram ainda em desenvolvimento e a espessura e o diâmetro da córnea são bastante inferiores aos registados para olhos de gado adulto. Porém, admite-se a utilização de córneas de animais jovens (6 a 12 meses de idade), por haver algumas vantagens, como maior facilidade de obtenção, um intervalo etário estreito e menor risco de exposição dos trabalhadores à encefalopatia espongiforme bovina (BSE) (15). Dado que seria útil avaliar melhor o efeito da dimensão ou espessura da córnea na reação a produtos químicos corrosivos ou irritantes, incentivam-se os utilizadores a indicarem a idade e/ou o peso estimados dos animais de origem das córneas utilizadas no estudo.

Colheita e transporte dos olhos para o laboratório

A colheita dos olhos é efetuada por empregados do matadouro. Para minimizar lesões mecânicas ou outros danos aos olhos, estes devem ser retirados das órbitas o mais rapidamente possível depois da morte e ser refrigerados imediatamente após a enucleação e durante o transporte. Para evitar que os olhos sejam expostos a produtos químicos potencialmente irritantes, os empregados do matadouro não devem utilizar detergentes na lavagem da cabeça do animal.

Utilizando um recipiente de tamanho adequado, mergulham-se os olhos completamente em solução HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) refrigerada e transportam-se para o laboratório de uma maneira que minimize a deterioração e contaminações bacteriológicas. Como são colhidos durante o processo de abate, os olhos podem ser expostos a sangue e outras matérias biológicas, incluindo bactérias e outros microrganismos. Importa, pois, minimizar o risco de contaminação (por exemplo mantendo o recipiente dos olhos em gelo fundente durante a colheita e o transporte e adicionando antibióticos — tais como penicilina a 100 UI/ml e estreptomicina a 100 $\mu\text{g/ml}$ — ao HBSS no qual se mergulham os olhos durante o transporte).

O intervalo entre a colheita dos olhos e a utilização das córneas no método BCOP deve ser mínimo (normalmente, os olhos devem ser colhidos e utilizados no mesmo dia) e não deve, comprovadamente, comprometer os resultados do ensaio. Os resultados dos ensaios estão relacionados com os critérios de seleção dos olhos e com as reações às amostras de controlo positivas e negativas. Os olhos utilizados num ensaio devem ser todos do mesmo grupo de colheita num determinado dia.

Crítérios de seleção dos olhos utilizados no método BCOP

Uma vez chegados ao laboratório, examinam-se cuidadosamente os olhos para detetar eventuais defeitos, nomeadamente aumento de opacidade, escoriações e neovascularização. Só podem ser utilizadas córneas de olhos sem estes defeitos.

Também se avalia a qualidade da córnea em fases posteriores do ensaio. Descartam-se as córneas que, após um período inicial de uma hora para estabelecimento do equilíbrio, apresentem opacidade superior a sete unidades, ou opacidade equivalente para o opacímetro e os suportes de córnea utilizados (NOTA: calibrar o opacímetro com os padrões de opacidade utilizados para estabelecer as unidades de opacidade — ver o apêndice 4).

Cada grupo de tratamento (produto químico em estudo e amostras de controlo positivas e negativas ensaiadas em paralelo) é constituído por um mínimo de três olhos. Utilizam-se três córneas para amostras de controlo negativas de córnea no método de ensaio BCOP. Como as córneas são excisadas do globo ocular e colocadas nas câmaras, há potencial para a ocorrência de artefactos resultantes da manipulação, com incidência nos valores individuais de opacidade e permeabilidade da córnea (incluindo as amostras de controlo negativas). Os valores de opacidade e permeabilidade das córneas das amostras de controlo negativas são utilizados para corrigir os valores de opacidade e permeabilidade da córnea correspondentes ao produto químico em estudo e às amostras tratadas para controlo positivo utilizados no cálculo da IVIS.

PROTOCOLO DE ENSAIO

Preparação dos olhos

Dissecam-se córneas sem defeitos, deixando uma orla de 2-3 mm de esclerótica, para facilitar o manuseamento, e tomando as precauções necessárias para não danificar o epitélio e o endotélio da córnea. Coloca-se cada córnea num suporte especialmente concebido, constituído por um compartimento anterior e um compartimento posterior. O primeiro estabelece uma interface com a superfície epitelial da córnea; o segundo, com a superfície endotelial da mesma. Enchem-se as duas câmaras, até transbordar, com Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) isento de vermelho de fenol, previamente aquecido, começando pela câmara posterior e evitando a formação de bolhas. Coloca-se em seguida a dispositivo à temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$ durante, pelo menos, uma hora, para que as córneas fiquem em equilíbrio com o meio e, tanto quanto possível, readquiram a sua atividade metabólica normal (a temperatura aproximada da superfície da córnea *in vivo* é de 32°C).

Terminado o período previsto para se atingir o equilíbrio, adiciona-se EMEM isento de vermelho de fenol fresco pré-aquecido a ambas as câmaras e efetua-se a leitura da linha de base de opacidade para cada córnea. Descartam-se as córneas que evidenciem lesões macroscópicas nos tecidos (por exemplo escoriações, pigmentação ou neovascularização), opacidade superior a 7 unidades ou opacidade equivalente para o opacímetro e os suportes de córnea utilizados. Seleccionam-se, para córneas de controlo negativas (ou de controlo do solvente), pelo menos três córneas. Distribuem-se a seguir as córneas restantes em dois grupos: córneas a submeter ao tratamento e córneas de controlo positivo.

Dado que a sua capacidade calorífica é superior à do ar, a água oferece condições de temperatura mais estáveis para incubação. Recomenda-se, portanto, a utilização de um banho-maria para manter o suporte de córnea e o seu conteúdo a $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Admite-se, porém, a utilização de incubadores a ar, tomando as precauções necessárias para manter a temperatura estável (por exemplo aquecendo previamente os suportes e o meio de ensaio).

Aplicação do produto químico em estudo

Utiliza-se um protocolo de tratamento para líquidos e agentes tensioativos (sólidos ou líquidos) e outro para sólidos não-tensioativos.

Os líquidos são ensaiados sem diluição. Os semissólidos, cremes e ceras são normalmente ensaiados como se fossem líquidos. As substâncias tensioativas são ensaiadas à concentração de 10 % (m/v) numa solução a 0,9 % de cloreto de sódio, em água destilada ou noutro solvente comprovadamente sem efeitos adversos no sistema de ensaio. É necessário justificar convenientemente o recurso a outra diluição. As misturas que contenham agentes tensioativos podem ser ensaiadas sem diluição ou diluídas a uma concentração que se adeque ao cenário de exposição *in vivo* em causa. É necessário justificar convenientemente as concentrações ensaiadas. Expõem-se as córneas aos líquidos e aos agentes tensioativos durante 10 minutos. Se forem utilizados tempos de exposição diferentes, será necessário justificá-lo em termos científicos. Ver no apêndice 1 as definições de agente tensioativo e de mistura com agentes tensioativos.

Os sólidos não-tensioativos são normalmente ensaiados em solução ou suspensão, à concentração de 20 % (m/v), numa solução a 0,9 % de cloreto de sódio, em água destilada ou noutro solvente comprovadamente sem efeitos adversos no sistema de ensaio. Em determinadas circunstâncias e mediante justificação científica adequada, também pode ensaiar-se um sólido tal e qual, mediante aplicação direta na superfície da córnea pelo método da câmara aberta (ponto 32). Expõem-se as córneas aos sólidos durante quatro horas, mas, tal como no caso dos líquidos e dos produtos tensioativos, podem utilizar-se tempos de exposição diferentes, a justificar em termos científicos.

Podem ser utilizados diversos métodos de tratamento, consoante a natureza física e as características químicas do produto químico em estudo (sólidos, líquidos, líquidos viscosos ou não-viscosos etc.). O aspeto crítico é garantir que o produto químico cobre adequadamente a superfície epitelial e é adequadamente removido na fase de lavagem. Utiliza-se normalmente um método de câmara fechada para o ensaio de líquidos não-viscosos ou ligeiramente viscosos e um método de câmara aberta para o ensaio de líquidos semiviscosos ou viscosos, bem como para sólidos aplicados diretamente.

No método da câmara fechada, introduz-se na câmara anterior, através dos orifícios de dosagem existentes na parte de cima desta, uma quantidade do produto químico em estudo suficiente para cobrir a superfície epitelial da córnea (750 µl), fechando em seguida os orifícios com as respetivas tampas durante a exposição. É importante que cada córnea seja exposta ao produto químico em estudo durante o período adequado.

No método da câmara aberta, removem-se, antes do tratamento, a janela de vidro e o anel de fixação da janela da câmara anterior. Com uma micropipeta, aplica-se o produto químico em estudo ou de controlo diretamente na superfície epitelial da córnea (750 µl ou um volume do produto químico em estudo suficiente para cobrir completamente a córnea). Se for difícil pipetá-lo, o produto químico em estudo pode ser introduzido sob pressão numa pipeta volumétrica, para facilitar a dosagem. Para que a matéria em causa possa ser introduzida sob pressão na ponta da pipeta volumétrica, insere-se esta ponta na extremidade da seringa. Pressiona-se o êmbolo da seringa e, simultaneamente, puxa-se o pistão da pipeta para cima. Caso se formem bolhas de ar na ponta da pipeta, remove-se (expulsa-se) o produto químico em estudo e repete-se o processo, até a ponta da pipeta ficar cheia, sem bolhas de ar. Se necessário, pode utilizar-se uma seringa normal (sem agulha), pois permite medir um volume exato do produto químico em estudo e facilita a aplicação na superfície epitelial da córnea. Depois da dosagem, recoloca-se a janela de vidro na câmara anterior, para recriar um sistema fechado.

Incubação após a exposição

Após o período de exposição, removem-se da câmara anterior o produto químico em estudo, a amostra de controlo negativa ou o produto químico de controlo positivo e lava-se o epitélio pelo menos três vezes (ou até deixar de se ver produto químico em estudo) utilizando EMEM com vermelho de fenol. Utiliza-se na lavagem meio de ensaio com vermelho de fenol, porque pode seguir-se a evolução cromática do vermelho de fenol para determinar a eficácia de lavagem de produtos químicos ácidos ou alcalinos. Lavam-se as córneas mais de três vezes se a cor do vermelho de fenol continuar alterada (amarelo ou púrpura) ou o produto químico em estudo ainda for visível. Quando o meio já não contiver o produto químico em estudo, lavam-se as córneas uma última vez utilizando EMEM sem vermelho de fenol, para garantir a remoção deste último da câmara anterior antes da medição de opacidade. Volta então a encher-se a câmara anterior com EMEM fresco sem vermelho de fenol.

No caso dos líquidos ou dos agentes tensioativos, após a lavagem, incubam-se as córneas durante mais duas horas a 32 ± 1 °C. Em determinadas circunstâncias, pode ser útil um tempo de incubação mais longo depois da exposição, a ponderar caso a caso. As córneas tratadas com sólidos são bem lavadas no final do período de exposição de quatro horas, mas não é necessária incubação suplementar.

Regista-se a opacidade e a permeabilidade de cada córnea logo que terminar o período de incubação após a exposição, no caso dos líquidos e dos agentes tensioativos, ou o período de exposição de quatro horas, no caso dos sólidos não-tensioativos. Examina-se ainda visualmente cada córnea e registam-se as observações pertinentes (descamação de tecidos, resíduos do produto químico em estudo, perfil de opacidade não-uniforme etc.). Estas observações podem ser importantes, pois são passíveis de se traduzirem em variações nas leituras do opacímetro.

Produtos químicos de controlo

Em cada ensaio ensaiam-se em paralelo amostras de controlo positivas e negativas (ou do solvente/excipiente).

Ao ensaiar pelo método BCOP substâncias líquidas a 100 %, ensaia-se em paralelo uma amostra de controlo negativa (por exemplo solução a 0,9 % de cloreto de sódio ou água destilada), para possibilitar a deteção de alterações inespecíficas do sistema de ensaio e estabelecer uma linha de base para os parâmetros a determinar no ensaio. Essa amostra de controlo visa igualmente evitar que as condições do ensaio provoquem, inadequadamente, uma reação de irritação.

Ao ensaiar líquidos diluídos, agentes tensoativos ou sólidos, inclui-se no método BCOP um grupo paralelo de amostras de controlo do excipiente/solvente, para possibilitar a deteção de alterações inespecíficas do sistema de ensaio e estabelecer uma linha de base para os parâmetros a determinar no ensaio. Só podem utilizar-se solventes/excipientes que, comprovadamente, não tenham efeitos adversos no sistema de ensaio.

Para verificar a integridade e o bom funcionamento do sistema de ensaio, inclui-se em cada ensaio um produto químico que reconhecidamente induza reação positiva, para servir de amostra de controlo positiva paralela. Porém, para que possa determinar-se a variabilidade no tempo da reação à referida amostra de controlo positiva, a reação de irritação não deve ser excessivamente forte.

Como amostras de controlo positivas para produtos químicos em estudo líquidos, podem ser utilizados, por exemplo, etanol a 100 % e dimetilformamida a 100 %. Como amostra de controlo positiva para produtos químicos em estudo sólidos, pode utilizar-se, por exemplo, uma solução a 0,9 % de cloreto de sódio com 20 % (m/v) de imidazole.

Os produtos químicos de referência são úteis para avaliar o potencial de irritação ocular de produtos químicos desconhecidos de uma determinada classe química ou classe de produtos, ou para avaliar o potencial de irritação relativo de um irritante ocular numa determinada gama de reações de irritação.

Parâmetros medidos

Determina-se a opacidade com base na quantidade de luz transmitida através da córnea. Determina-se quantitativamente a opacidade da córnea medindo-a com um opacímetro numa escala contínua de valores de opacidade.

Determina-se a permeabilidade com base na quantidade do corante fluoresceína de sódio que penetra em todas as camadas celulares da córnea (ou seja, desde o epitélio da superfície exterior da córnea até ao endotélio da sua superfície interior). Coloca-se 1 ml de solução de fluoresceína de sódio (4 ou 5 mg/ml, consoante se ensaiem líquidos ou agentes tensoativos, por um lado, ou sólidos não-tensoativos, por outro) na câmara anterior do suporte de córnea, que estabelece interface com a superfície epitelial da córnea. Enche-se com EMEM fresco a câmara posterior, que estabelece interface com a superfície endotelial da córnea. Incuba-se a seguir o suporte, em posição horizontal, durante 90 ± 5 minutos, a 32 ± 1 °C. Determina-se quantitativamente, por espectrofotometria UV/VIS, a quantidade de fluoresceína de sódio que atravessa a córnea para a câmara posterior. Os valores das medições espectrofotométricas a 490 nm são registados numa escala contínua de absorvência ou densidade ótica (DO_{490}). Determinam-se os valores de permeabilidade à fluoresceína utilizando os valores de DO_{490} obtidos com um espectrofotómetro de luz visível num percurso ótico normalizado de 1 cm.

Em alternativa, pode utilizar-se um dispositivo de leitura constituído por uma placa de microtitulação de 96 alvéolos, desde que: i) seja possível estabelecer uma gama de linearidade do leitor de placa para a determinação de valores de DO_{490} da fluoresceína; ii) se utilize na placa de 96 alvéolos o volume de amostras de fluoresceína que permite obter corretamente valores de DO_{490} equivalentes aos obtidos com o percurso ótico normalizado de 1 cm (normalmente 360 µl, podendo ser necessário encher completamente os alvéolos).

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação dos dados

Depois de se corrigirem os valores de opacidade e de permeabilidade média (DO_{490}) em função dos valores da opacidade de fundo e da permeabilidade (DO_{490}) correspondente à amostra de controlo negativa, combinam-se numa fórmula empírica os valores médios de opacidade e de permeabilidade (DO_{490}) correspondentes a cada grupo de tratamento, a fim de calcular a respetiva pontuação de irritação *in vitro* (IVIS), do seguinte modo:

$$\text{IVIS} = \text{valor médio de opacidade} + 15 \times \text{valor médio de permeabilidade } (DO_{490})$$

Sina *et al.* (16) referiram que esta fórmula foi estabelecida com base em estudos no seu laboratório e interlaboratoriais. A fim de determinar a equação que melhor correlacionava os dados *in vivo* e *in vitro*, fez-se uma análise multivariada dos dados obtidos num estudo multilaboratorial de uma série de 36 compostos. Essa análise foi efetuada por cientistas de duas empresas distintas, que chegaram a duas equações praticamente idênticas.

Os valores de opacidade e de permeabilidade devem ser também avaliados independentemente uns dos outros, para determinar se o produto químico em estudo induz corrosividade ou irritação severa com base em apenas um dos dois parâmetros medidos (ver «Critérios de decisão»).

Critérios de decisão

Seguem-se os valores-limite de pontuação de irritação *in vitro* (IVIS) para a identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU) e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves («nenhuma categoria» do sistema GHS da ONU):

IVIS	Sistema GHS da ONU
≤ 3	Nenhuma categoria
$> 3; \leq 55$	Nenhuma previsão possível
> 55	Categoria 1

Critérios de aceitação do estudo

Considera-se o ensaio aceitável se a IVIS correspondente à amostra de controlo positiva não se desviar da média histórica vigente mais que o dobro do desvio-padrão. Essa média deve ser atualizada pelo menos de três em três meses ou sempre que se efetue um ensaio aceitável num laboratório que proceda a estes ensaios com pouca frequência (menos de uma vez por mês). Os valores de opacidade e permeabilidade correspondentes às amostras de controlo negativas e do solvente/excipientes devem ser inferiores aos limites superiores estabelecidos para os valores de opacidade e permeabilidade de fundo de córneas de bovino tratadas com os respetivos amostra de controlo negativa e solvente/excipientes. Quando a classificação do produto químico em estudo é inequívoca, basta normalmente uma série de ensaios constituída por, pelo menos, três córneas. Porém, nos casos de resultados inconclusivos na primeira série de ensaios, é de ponderar (mas não necessariamente exigível) a realização de uma segunda série de ensaios, e até de uma terceira se os resultados médios da IVIS das duas primeiras séries forem discordantes. Neste contexto, considera-se inconclusivo o resultado da primeira série de ensaios se as previsões referentes às três córneas não forem concordantes, do seguinte modo:

- as previsões referentes a duas das três córneas são discordantes da média correspondente às três córneas; OU
- a previsão referente a uma das três córneas é discordante da média correspondente às três córneas E o resultado discordante difere mais de 10 unidades de IVIS do valor-limite de 55.
- Se a repetição da série de ensaios corroborar a previsão da série de ensaios inicial (em termos de valor médio da IVIS), pode ser tomada uma decisão final sem necessidade de ensaios complementares. Se a repetição da série de ensaios não corroborar a previsão da série de ensaios inicial (em termos de valor médio da IVIS), deve realizar-se uma terceira e derradeira série de ensaios, para resolver as previsões equívocas e classificar o produto químico em estudo. Se de alguma série de ensaios resultar uma previsão de categoria 1 do sistema GHS da ONU, pode dispensar-se a realização de ensaios complementares para classificação e rotulagem.

Relatório do ensaio

O relatório do ensaio deve incluir os seguintes elementos que tenham pertinência na realização do estudo em causa:

Produtos químicos em estudo e de controlo

- Denominação(ões) química(s), como a denominação estrutural utilizada pelo *Chemical Abstracts Service* (CAS), seguida de outras denominações, se existirem; número de registo CAS, se conhecido;

- Grau de pureza e composição do produto químico em estudo/de controlo (em percentagem ponderal), se conhecidos;
- Propriedades físico-químicas (por exemplo: estado físico, volatilidade, pH, estabilidade, classe química, hidrossolubilidade) relevantes para a realização do estudo;
- Pré-tratamento dos produtos químicos em estudo/de controlo, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Estabilidade, se conhecida.

Informações relativas ao patrocinador e ao laboratório

- Nome e endereço do patrocinador, do laboratório e do diretor do estudo.

Condições do método de ensaio

- Opacímetro utilizado (modelo e especificações, por exemplo) e regulações desse instrumento;
- Informações sobre a calibração dos dispositivos utilizados para medir a opacidade e a permeabilidade (por exemplo: opacímetro e espectrofotómetro), que garantam a linearidade das medições;
- Tipo de suportes de córnea utilizado (modelo e especificações, por exemplo);
- Descrição de outros equipamentos utilizados;
- Processo utilizado para garantir a integridade (exatidão e fiabilidade) do método de ensaio ao longo do tempo (por exemplo: ensaio periódico dos produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica).

Critérios de aceitação do ensaio

- Amostras de controlo positivas e negativas ensaiadas em paralelo, situadas num intervalo aceitável, com base nos dados históricos;
- Se for aplicável, intervalos aceitáveis das amostras de referência de controlo ensaiadas em paralelo, com base nos dados históricos.

Colheita e preparação dos olhos

- Indicação da origem dos olhos (ou seja, da instalação na qual foram colhidos);
- Diâmetro das córneas, relacionado com a idade dos animais donde provêm e uma medida da adequação destes para o ensaio;
- Condições de armazenagem e de transporte dos olhos (data-hora da colheita dos olhos, tempo decorrido até ao início dos ensaios, meios de transporte e condições de temperatura durante o transporte, antibióticos eventualmente utilizados etc.);
- Preparação e montagem das córneas de bovino, incluindo informações sobre a qualidade das córneas, a temperatura dos suportes de córnea e os critérios de seleção das córneas utilizadas no ensaio.

Protocolo de ensaio

- Número de replicados utilizados;
- Identificação das amostras de controlo negativa e positiva utilizadas (e das amostras de controlo de referência e do solvente, se for caso disso);
- Concentração(ões) do produto químico em estudo, aplicação deste, tempo de exposição e tempo de incubação após a exposição;
- Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;
- Descrição dos critérios de aceitação do estudo utilizados;
- Descrição de eventuais modificações ao protocolo do ensaio;
- Descrição dos critérios de decisão utilizados.

Resultados

- Quadro dos resultados correspondentes a cada amostra em estudo (por exemplo: valores de opacidade e de DO_{490} e valor calculado da IVIS para o produto químico em estudo e para as amostras de controlo positivas, negativas e de referência (se for o caso), sob a forma de quadro, incluindo os dados correspondentes aos replicados efetuados, e médias $\pm$ desvio-padrão para cada ensaio);
- Descrição de outros efeitos eventualmente observados;
- Classificação *in vitro* segundo o sistema GHS da ONU, se for o caso.

Discussão dos resultados

Conclusões

REFERÊNCIAS

- 1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report — *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm].
- 2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.: 10-7553. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>].
- 3) OCDE (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189. OCDE, Paris.
- 4) ONU (2011). Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS), ST/SG/AC.10/30 — Rev. 4. Nova Iorque e Genebra: Nações Unidas. Disponível em: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html].
- 5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro*, 24:1-9.
- 6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report — *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm].
- 7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
- 8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay — SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Itália: Centro Europeu de validação de métodos alternativos (ECVAM).
- 9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D., Sina, J.F. (1992) Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18:442-449.

- 10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro*, 20:78-81.
- 11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponível em: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- 12) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.*, 36:106-117.
- 13) OCDE (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adoptado em 25 de outubro de 2011. Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos (OCDE), Paris.
- 14) Doughty, M.J., Petrou, S., Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.*, 73:2159-2165.
- 15) Collee, J., Bradley, R. (1997). BSE: A decade on — Part I. *The Lancet*, 349:636-641.
- 16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 26:20-31.
- 17) Capítulo B.5 deste anexo, «Irritação/corrosão ocular agudas».
- 18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].
- 19) OCDE (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, No. 1. OECD Principles on Good Laboratory Practice (revisto em 1997).

Disponível em: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida da eficiência do método e um dos aspetos da «adequação». Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos do método de ensaio.

Produto químico de referência: Produto químico utilizado como padrão de comparação com o produto químico em estudo. Deve ter as seguintes propriedades: i) origem ou origens uniformes e fiáveis; ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de produtos químicos em estudo; iii) características físico-químicas conhecidas; iv) disponibilidade de dados sobre os efeitos conhecidos; v) potência conhecida situada na gama de reação pretendida.

Abordagem ascendente: Metodologia por etapas utilizada para produtos químicos que se pense não necessitarem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves; inicia-se com a determinação de produtos químicos que não careçam de classificação (resultado negativo) a partir de outros produtos químicos (resultado positivo).

Produto químico: Substância ou mistura.

Córnea: Parte anterior transparente do globo ocular que recobre a íris e a pupila e deixa passar a luz para o interior.

Opacidade da córnea: Medida do grau de opacidade da córnea depois de exposta ao produto químico em estudo. Um aumento de opacidade da córnea é indicador de lesão da córnea. A opacidade pode ser avaliada subjetivamente, como no ensaio ocular no coelho pelo método de Draize, ou objetivamente, utilizando um instrumento como um «opacímetro».

Permeabilidade da córnea: Medição quantitativa da lesão epitelial da córnea por determinação da quantidade do corante fluoresceína de sódio que atravessa todas as camadas celulares da córnea.

Irritação ocular: Alterações oculares em consequência da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, totalmente reversíveis nos 21 dias após a aplicação. Este termo e os termos «efeitos oculares reversíveis» ou «categoria 2 do sistema GHS da ONU» (4) são utilizados indistintamente.

Taxa de falsos negativos: Proporção dos produtos químicos positivos que o método de ensaio considera, erradamente, negativos. É um dos indicadores da eficiência dos métodos de ensaio.

Taxa de falsos positivos: Proporção dos produtos químicos negativos que o método de ensaio considera, erradamente, positivos. É um dos indicadores da eficiência dos métodos de ensaio.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente ou de uma situação, suscetível de causar efeitos adversos num organismo, sistema ou (sub)população que seja exposto ao agente em causa.

Pontuação de irritação *in vitro* (IVIS): Fórmula empírica, utilizada no método de ensaio BCOP, que combina os valores médios de opacidade e de permeabilidade referentes a um grupo de tratamento numa pontuação *in vitro* única para esse grupo. $IVIS = \text{valor médio de opacidade} + 15 \times \text{valor médio de permeabilidade}$.

Efeitos oculares irreversíveis: Ver «Lesões oculares graves».

Mistura: Mistura ou solução constituída por duas ou mais substâncias que nela não reagem (4).

Amostra de controlo negativa: Replicado não-tratado que contém todos os componentes do sistema de ensaio. Esta amostra é ensaiada juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para determinar se o solvente interage com o sistema de ensaio.

Não-classificado: Produtos químicos não classificados em termos de irritação ocular (categorias 2, 2A ou 2B do sistema GHS da ONU) nem de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU). Designação utilizada indistintamente com a classificação «nenhuma categoria no sistema GHS da ONU».

Opacímetro: Instrumento utilizado para medir a «opacidade da córnea» por determinação quantitativa da luz transmitida através da córnea. Normalmente, o instrumento tem dois compartimentos, dispondo cada um deles de uma fonte luminosa e de uma célula fotoelétrica. Um compartimento é utilizado para a córnea tratada e o outro para calibrar o instrumento e regular o zero deste. Envia-se luz de uma lâmpada de halógeno, através de um compartimento de controlo (câmara vazia, sem janelas nem líquido), para uma célula fotoelétrica e compara-se com a luz igualmente enviada para uma célula fotoelétrica através do compartimento experimental, que compreende a câmara na qual se colocou a córnea. O dispositivo compara a luz transmitida para as células fotoelétricas, determina a diferença e exibe o valor numérico da opacidade num visor digital.

Amostra de controlo positiva: Replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com um produto químico que comprovadamente induz reação positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade, ao longo do tempo, da reação a esta amostra de controlo, essa reação não deve ser excessivamente forte.

Efeitos oculares reversíveis: Ver «irritação ocular».

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial, bem como da repetibilidade intralaboratorial.

Lesões oculares graves: Lesão do tecido ocular ou degradação grave da visão em consequência da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação. Este termo e os termos «efeitos oculares irreversíveis» ou «categoria 1 do sistema GHS da ONU» (4) são utilizados indistintamente.

Amostra de controlo do solvente/excipiente: Amostra não-tratada que contém todos os componentes do sistema de ensaio, incluindo o solvente ou excipiente, e é ensaiada, juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para estabelecer a linha de base de reação para as amostras tratadas com o produto químico em estudo, dissolvido no mesmo solvente ou excipiente. Quando ensaiada em paralelo com uma amostra de controlo negativa, esta amostra também permite determinar se o solvente ou excipiente interage com o sistema de ensaio.

Substância: Elemento químico ou composto de um elemento químico no estado natural ou obtido por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo solventes que possam ser separados sem afetar a estabilidade da substância nem lhe modificar a composição (4).

Agente tensioativo: Substância, como um detergente, capaz de reduzir a tensão superficial de líquidos, permitindo-lhes formar espumas ou penetrar em sólidos; igualmente designado por «agente molhante».

Mistura com agentes tensioativos: No contexto deste método de ensaio, é uma mistura que contém um ou mais agentes tensioativos em concentração final superior a 5 %.

Abordagem descendente: Metodologia por etapas utilizada para produtos químicos que se suspeite causarem lesões oculares graves; inicia-se com a determinação de produtos químicos que induzam lesões oculares graves (resultado positivo) a partir de outros produtos químicos (resultado negativo).

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

Estratégia de ensaio sequencial por etapas: Estratégia sequencial de ensaio em que, seguindo uma ordem estabelecida, se avalia toda a informação disponível sobre o produto químico em estudo, por um processo baseado na ponderação da suficiência da prova em cada etapa, com o objetivo de determinar se há informação suficiente para uma decisão de classificação de perigosidade antes de passar à etapa seguinte. Se a informação existente possibilitar a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, não serão necessários mais ensaios. Se a informação existente não possibilitar a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, procede-se a uma série de ensaios sequenciais em animais até ser possível atribuir uma classificação inequívoca.

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS): Sistema (designado em inglês por *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa, com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência etc.) e do ambiente (4).

Categoria 1 do sistema GHS da ONU: Ver «Lesões oculares graves».

Categoria 2 do sistema GHS da ONU: Ver «irritação ocular».

Nenhuma categoria no sistema GHS da ONU: Produtos químicos que não preenchem os requisitos da classificação nas categorias 1 ou 2 (2A ou 2B) do sistema GHS da ONU. Este termo e o termo «não-classificado» são utilizados indistintamente.

Método de ensaio validado: Método de ensaio relativamente ao qual foram concluídos estudos de validação com vista a determinar a sua adequação (incluída a exatidão) e a sua fiabilidade para um determinado fim. Importa referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exato e fiável para se considerar aceitável para o fim pretendido.

Ponderação da suficiência da prova: Processo que consiste em ponderar os pontos fortes e os pontos fracos dos vários elementos de informação para tirar conclusões fundamentadas sobre o potencial de perigosidade do produto químico.

Apêndice 2

CAPACIDADE DE PREVISÃO DO MÉTODO DE ENSAIO BCOP

Quadro 1

Capacidade de previsão do método BCOP na identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves [categoria 1 ou não (categoria 2 + nenhuma categoria) no sistema GHS da ONU/CRE da UE; categoria I ou não (categoria II + categoria III + categoria IV) no sistema EPA dos E.U.A.].

Sistema de classificação	N.º	Exatidão		Sensibilidade		Falsos negativos		Especificidade		Falsos positivos	
		%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º
Sistema GHS da ONU	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
Sistema CRE da UE											
Sistema EPA dos E.U.A.	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Quadro 2

Capacidade de previsão do método BCOP na identificação de produtos químicos que não necessitam de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves («não-irritantes») [nenhuma categoria ou não (categoria 1 + categoria 2) no sistema GHS da ONU/CRE da UE; categoria IV ou não (categoria I + categoria II + categoria III) no sistema EPA dos E.U.A.].

Sistema de classificação	N.º	Exatidão		Sensibilidade		Falsos negativos		Especificidade		Falsos positivos	
		%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º
Sistema GHS da ONU	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
Sistema CRE da UE											
Sistema EPA dos E.U.A.	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

Apêndice 3

PRODUTOS QUÍMICOS RECOMENDADOS PARA DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA TÉCNICA NO MÉTODO DE ENSAIO DE OPACIDADE E PERMEABILIDADE DA CÓRNEA EM BOVINOS (BCOP)

Antes de este método de ensaio passar a ser utilizado por rotina, os laboratórios devem comprovar a sua competência técnica identificando corretamente a classificação de perigosidade ocular dos 13 produtos químicos recomendados no quadro 1. Estes produtos químicos foram selecionados de modo a representarem a gama de reações de perigo ocular obtidas no ensaio ocular *in vivo* no coelho (TG 405) (17), com base no sistema de classificação GHS da ONU (categorias 1, 2A, 2B ou não-classificado) (4). Outros critérios de seleção foram a disponibilidade do produto químico no comércio, a existência de dados de referência *in vivo* de alta qualidade e a existência de dados *in vitro* de alta qualidade pelo método BCOP. O *Streamlined Summary Document* (3) e o *Background Review Document* do ICCVAM relativo ao método de ensaio BCOP (2) (18) contêm dados de referência.

Quadro 1

Produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica no método BCOP.

Produto químico	N.º CAS (CASRN)	Classe química ⁽¹⁾	Fase	Classificação <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Classificação pelo método BCOP
Cloreto de benzalcónio (5 %)	8001-54-5	Sal de amónio quaternário	Líquida	Categoria 1	Categoria 1
Clorexidina	55-56-1	Amina, amidina	Sólido	Categoria 1	Categoria 1
Ácido dibenzoil-L-tartárico	2743-38-6	Ácido carboxílico, éster	Sólida	Categoria 1	Categoria 1
Imidazole	288-32-4	Composto heterocíclico	Sólida	Categoria 1	Categoria 1
Ácido tricloroacético (30 %)	76-03-9	Ácido carboxílico	Líquida	Categoria 1	Categoria 1
Cloreto de 2,6-diclorobenzoílo	4659-45-4	Halogeneto de acilo	Líquida	Categoria 2A	Previsão exata/fiável impossível
2-Metilacetoacetato de etilo	609-14-3	Cetona, éster	Líquida	Categoria 2B	Previsão exata/fiável impossível
Nitrato de amónio	6484-52-2	Sal inorgânico	Sólida	Categoria 2 ⁽³⁾	Previsão exata/fiável impossível
EDTA, sal dipotássico	25102-12-9	Amina, ácido carboxílico (sal)	Sólida	Não-classificado	Não-classificado
Tween 20	9005-64-5	Éster, poliéter	Líquida	Não-classificado	Não-classificado

Produto químico	N.º CAS (CASRN)	Classe química ⁽¹⁾	Fase	Classificação <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Classificação pelo método BCOP
2-Mercaptopirimi- dina	1450-85-7	Halogeneto de acilo	Sólida	Não classificado	Não classificado
Fenilbutazona	50-33-9	Composto hetero- cíclico	Sólida	Não-classificado	Não-classificado
Éter laurílico de po- lioxietileno (23) (BRIJ 35) (10 %)	9002-92-0	Álcool	Líquida	Não-classificado	Não-classificado

Abreviaturas: CASRN = Número de registo do *Chemical Abstracts Service*.

⁽¹⁾ Os produtos químicos foram classificados em classes químicas segundo um sistema normalizado, com base nos *Medical Subject Heading* («classificadores de temas médicos», MeSH) da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos da América (<http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Com base nos resultados do ensaio ocular *in vivo* no coelho (TG 405 da OCDE) (17) e no sistema GHS da ONU (4).

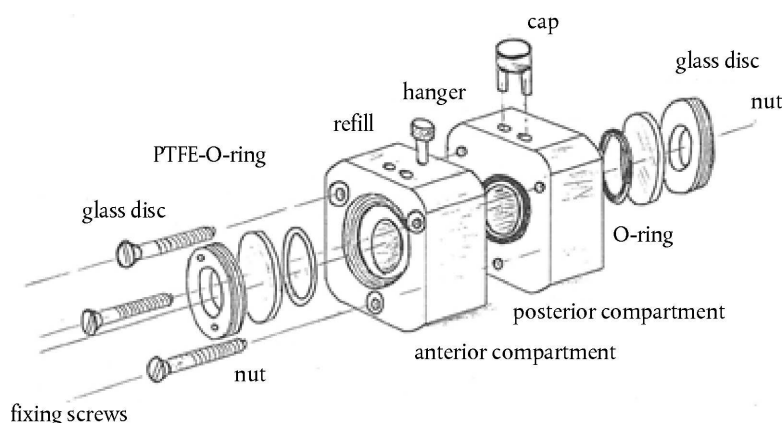
⁽³⁾ A classificação na categoria 2A ou 2B depende da interpretação do critério do sistema GHS da ONU para distinguir estas categorias: se para a classificação 2A poder ser atribuída é necessário que 1 em 3 ou que 2 em 3 animais exibam efeitos ao sétimo dia. O estudo *in vivo* incidiu em 3 animais. Todos os animais recuperaram para a pontuação 0 ao sétimo dia, ou antes, em todos os parâmetros, exceto a vermelhidão da conjuntiva num animal. Ao sétimo dia, este animal apresentava vermelhidão da conjuntiva com pontuação 1; ao décimo dia, estava totalmente recuperado.

Apêndice 4

SUPORTE DE Córnea PARA O ENSAIO BCOP

Os suportes de córnea utilizados no método BCOP são feitos de um material inerte (por exemplo, polipropileno) e constituídos por duas metades (uma anterior e outra posterior), possuindo duas câmaras cilíndricas internas semelhantes. Está previsto cada câmara conter um volume de cerca de 5 ml. A câmara termina numa janela de vidro, através da qual são efetuadas as medições de opacidade. As dimensões interiores de cada câmara são 1,7 cm de diâmetro e 2,2 cm de profundidade ⁽¹⁾. Para evitar fugas, aplica-se uma anilha na câmara posterior. Coloca-se a córnea sobre a anilha da câmara posterior, com a parte endotelial voltada para esse lado, e aplica-se a câmara anterior sobre a parte epitelial da córnea. As câmaras são fixadas com três parafusos periféricos de aço inoxidável. Na extremidade de cada câmara existe uma janela de vidro, que pode ser retirada para facilitar o acesso à córnea. Novamente para evitar fugas, coloca-se uma anilha entre cada câmara e a janela de vidro. Para se poder introduzir e remover o meio de ensaio e os produtos químicos em estudo, há na parte superior de cada câmara dois orifícios, que são fechados com tampas de borracha durante os períodos de tratamento e de incubação. A transmissão de luz através dos suportes de córnea pode alterar-se porque o desgaste ou a acumulação de resíduos de determinados produtos químicos nos orifícios da câmara interna ou na janela de vidro podem afetar a refletância ou a dispersão da luz. Em consequência, a transmissão de luz através dos suportes de córnea correspondente à linha de base pode aumentar ou diminuir (e as leituras de opacidade correspondentes podem diminuir ou aumentar), podendo observar-se diferenças significativas em determinadas câmaras, nas medições iniciais de opacidade da córnea, relativamente ao esperado para a linha de base (isto é, os valores iniciais de opacidade da córnea em determinados suportes de córnea podem facilmente apresentar uma diferença de duas ou três unidades de opacidade em relação aos valores de linha de base esperados). O laboratório deve ponderar pôr em prática um programa de avaliação das variações de transmissão de luz através dos suportes de córnea, em função da natureza dos produtos químicos ensaiados e da frequência de utilização das câmaras. Para determinar os valores correspondentes à linha de base, os suportes de córnea podem ser verificados antes de começarem a ser utilizados, medindo os valores de opacidade (ou de transmissão de luz) correspondentes à linha de base das câmaras cheias com o meio completo, mas sem as córneas. Em seguida, verifica-se periodicamente, durante a utilização, se a transmissão de luz através dos suportes de córnea sofreu alguma variação. O laboratório pode estabelecer a frequência desta verificação dos suportes de córnea, com base nos produtos químicos ensaiados, na frequência de utilização e nas variações observadas nos valores de linha de base de opacidade da córnea. Caso se observem variações significativas da transmissão de luz através dos suportes de córnea, será necessário ponderar a aplicação de procedimentos adequados de limpeza e/ou polimento da superfície interna dos ditos suportes ou mesmo a sua substituição.

Suporte de córnea: Diagrama expandido.



⁽¹⁾ Estas dimensões referem-se a suportes de córnea utilizados para vacas com idade compreendida entre 12 e 60 meses. Se a idade dos animais se situar entre 6 e 12 meses, o suporte deve estar preparado para que cada câmara possa receber um volume de 4 ml, sendo as dimensões internas da câmara de 1,5 cm de diâmetro e 2,2 cm de profundidade. É muito importante que, em qualquer novo suporte de córnea que venha a ser concebido, a razão entre a superfície de córnea exposta e o volume da câmara posterior seja idêntica à que se verifica nos suportes de córnea convencionais. Isto é necessário para garantir que os valores de permeabilidade são determinados corretamente para o cálculo do IVIS pela fórmula proposta.

Apêndice 5

OPACÍMETRO

Trata-se de um dispositivo que mede a transmissão de luz. No caso do equipamento OP-KIT da Electro Design (Riom, França) utilizado na validação do método de ensaio BCOP, envia-se luz de uma lâmpada de halógeno, através de um compartimento de controlo (câmara vazia, sem janelas nem líquido), para uma célula fotoelétrica e compara-se com a luz igualmente enviada para uma célula fotoelétrica através do compartimento experimental, que compreende a câmara na qual se colocou a córnea. O dispositivo compara a luz transmitida para as células fotoelétricas, determina a diferença e exibe o valor numérico da opacidade num visor digital. Estabelecem-se as unidades de opacidade. Podem ser utilizados outros tipos de opacímetro, com uma configuração diferente (por exemplo: que não exijam a medição em paralelo do compartimento de controlo e do compartimento experimental), se comprovadamente derem resultados similares aos do equipamento validado.

O opacímetro deve responder linearmente num intervalo de valores de opacidade que cubra os limites utilizados para todas as classificações descritas no modelo de previsão (ou seja, até ao limite de corrosão/irritação severa). Para obter uma escala de leitura linear e exata até 75-80 unidades de opacidade, é necessário calibrar o opacímetro com uma série de calibradores. Para isso, colocam-se calibradores na câmara de calibração (câmara de suporte de córnea concebida para a inserção de calibradores) e efetuam-se as leituras correspondentes com o opacímetro. A câmara de calibração é desenhada de modo que os calibradores nela sejam inseridos a uma distância entre a fonte de luz e a célula fotoelétrica aproximadamente igual à utilizada nas medições de opacidade com córneas. Os valores de referência e o ponto de regulação inicial dependem do tipo de equipamento. É necessário aplicar a cada instrumento os procedimentos adequados para garantir a linearidade das medições de opacidade. Por exemplo, no caso do equipamento OP-KIT da Electro Design (Riom, França), começa-se por calibrar o zero do opacímetro utilizando a câmara de calibração sem nenhum calibrador. Em seguida, colocam-se sucessivamente nessa câmara três calibradores diferentes, medindo-se as opacidades respetivas. As leituras de opacidade correspondentes aos calibradores 1, 2 e 3 devem ser iguais aos respetivos valores estabelecidos – 75, 150 e 225 unidades de opacidade –, com um desvio de $\pm 5\%$.

13) Na parte B, o capítulo B.48 é substituído pelo seguinte texto:

«B.48 Método de ensaio em olhos de frango isolados para identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves

INTRODUÇÃO

Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline 438* (2013) da OCDE. O método de ensaio em olhos de frango isolados (*Isolated Chicken Eye* (ICE)) foi avaliado em 2006 e 2010 pelo ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*), em colaboração com o ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) e o JaCVAM (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*) (1) (2) (3). A primeira avaliação permitiu validar cientificamente a utilidade do método de ensaio ICE na despistagem de produtos químicos (substâncias e misturas) indutores de lesões oculares graves (categoria 1), conforme definição do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) da ONU (1) (2) (4) e do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CRE) ⁽¹⁾. A segunda avaliação incidiu na utilidade do método para a despistagem de produtos químicos não classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, conforme definição do sistema GHS da ONU (3) (4). Os resultados do estudo de validação e as recomendações do painel de pares avaliadores confirmaram a recomendação inicial no sentido da utilização do método ICE na classificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU), pois a base de dados disponível manteve-se inalterada desde a primeira validação pelo ICCVAM. Nessa fase, não se recomendou o alargamento do domínio de aplicabilidade do método ICE a outras categorias. Para ajuizar da utilidade do método ICE na identificação de produtos químicos a dispensar de uma classificação em termos de irritação ocular ou de lesões oculares graves, reavaliou-se a série de dados *in vitro* e *in vivo* utilizada no estudo de validação (5). Concluiu-se dessa reavaliação que o método

⁽¹⁾ 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).

ICE também pode ser utilizado na identificação de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, conforme definição do sistema GHS da ONU (4) (5). O presente método inclui as utilizações recomendadas e as limitações do método de ensaio ICE decorrentes das referidas avaliações. Principais diferenças entre a versão inicial de 2009 e a versão atualizada de 2013 do *Test Guideline* da OCDE (enumeração não-exaustiva): utilização do método ICE na identificação de produtos químicos que não necessitam de ser classificados no sistema de classificação GHS da ONU; atualização dos elementos a constar dos relatórios dos ensaios; atualização do apêndice 1, relativo às definições; atualização do apêndice 2, relativo à lista de produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica.

É geralmente aceite que, no futuro previsível, não estará disponível nenhum ensaio de irritação ocular *in vitro* único, alternativo ao ensaio ocular *in vivo* pelo método de Draize, para previsões em toda a gama de irritação que cubram as diferentes classes de produtos químicos. Porém, a combinação de vários métodos de ensaio alternativos no âmbito de uma estratégia de ensaio sequencial (por etapas) pode substituir-se ao ensaio ocular pelo método de Draize (6). A abordagem descendente (7) destina-se a ser utilizada quando, com base nas informações disponíveis, for previsível que o produto químico tenha elevado potencial irritante, ao passo que a abordagem ascendente (7) se destina a ser utilizada quando, com base nas informações disponíveis, for previsível que o produto químico não provoque irritação ocular suficiente para que seja necessário classificá-lo. O método de ensaio ICE é um método *in vitro* que pode ser utilizado em determinadas circunstâncias, respeitadas determinadas limitações, como descrito nos pontos 8 a 10, para classificar e rotular produtos químicos em função da perigosidade ocular dos mesmos. Embora não se considere, por si só, uma alternativa válida ao ensaio ocular *in vivo* no coelho, o método de ensaio ICE é recomendado como etapa inicial numa estratégia de ensaio do tipo da abordagem descendente proposta por Scott *et al.* (7) para identificar, sem necessidade de ensaios complementares, produtos químicos indutores de lesões oculares graves, isto é, produtos químicos classificáveis na categoria 1 do sistema GHS da ONU (4). O método ICE é igualmente recomendado para identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, conforme definição do sistema GHS da ONU («nenhuma categoria» NC) (4), pelo que pode constituir a etapa inicial numa estratégia de ensaio como a abordagem ascendente (7). Todavia, se a aplicação do método ICE a um determinado produto químico não permitir prever se este causa lesões oculares graves ou que não é necessário classificá-lo em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, o produto químico em causa terá de ser sujeito a ensaios adicionais (*in vitro* e/ou *in vivo*) para determinar a classificação definitiva. Por outro lado, as autoridades reguladoras competentes devem ser consultadas antes de se utilizar o método ICE numa abordagem ascendente no âmbito de sistemas de classificação diversos do sistema GHS da ONU.

Na descrição deste método de ensaio, pretende-se explicar o processo utilizado para avaliar o potencial de perigosidade ocular de um produto químico, medido pela capacidade deste de induzir toxicidade em olhos de frango desorbitados. Medem-se os efeitos tóxicos na córnea do seguinte modo: i) avaliação qualitativa da opacidade; ii) avaliação qualitativa das lesões epiteliais após aplicação de fluoresceína ao olho (retenção da fluoresceína); iii) determinação quantitativa do espessamento (edema); iv) avaliação qualitativa das lesões morfológicas macroscópicas na superfície. Após exposição ao produto químico em estudo, avaliam-se separadamente a opacidade, o edema e as lesões da córnea; em seguida, combinam-se os resultados a fim de obter a classificação de irritação ocular.

Estabelecem-se definições no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

Este método de ensaio baseia-se no protocolo proposto no documento de orientações n.º 160 da OCDE (8), que foi elaborado no seguimento de um estudo de validação internacional do ICCVAM (1) (3) (9) e contou com contributos do ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods), do JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) e do Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology do TNO (Países Baixos). O protocolo baseia-se na informação obtida nos protocolos publicados e no protocolo que está a ser utilizado pelo TNO (10) (11) (12) (13) (14).

Durante a validação deste método de ensaio, ensaiou-se uma vasta gama de produtos químicos, contando a base de dados empírica do estudo de validação com 152, distribuídos por 72 substâncias e 80 misturas (5). O método é aplicável a sólidos, líquidos, emulsões e géis. Os líquidos podem ser aquosos ou não e os sólidos podem ser solúveis ou insolúveis em água. O estudo de validação ainda não incidiu em gases e aerossóis.

O método ICE pode ser utilizado para identificar produtos químicos indutores de lesões oculares graves, ou seja, produtos químicos classificáveis na categoria 1 do sistema GHS da ONU (4). As limitações identificadas do método ICE, quando utilizado com essa finalidade, decorrem da elevada taxa de falsos positivos, no caso dos álcoois, e das elevadas taxas de falsos negativos, no caso dos sólidos e dos agentes tensioativos (1) (3) (9). As taxas de falsos negativos obtidas neste contexto (identificação de produtos químicos da categoria 1 do sistema GHS da ONU como não pertencentes a essa categoria) não constituem aspeto crítico, porque os produtos químicos que o ensaio considere negativos são seguidamente ensaiados por outros métodos *in vitro* adequadamente validados ou, em derradeira opção, no coelho, conforme as exigências normativas, por recurso a uma estratégia de ensaio sequencial baseada na ponderação da suficiência da prova. Importa salientar que os sólidos podem gerar condições de exposição variáveis e extremas no ensaio de irritação ocular *in vivo* pelo método de Draize, o que é suscetível de falsear as previsões do real potencial de irritação (15). Os investigadores podem ponderar o recurso a este método de ensaio para todos os tipos de produtos químicos, aceitando um resultado positivo como indicativo de lesões oculares graves, ou seja, merecedoras da classificação 1 do sistema GHS da ONU sem necessidade de ensaios complementares. Porém, os resultados positivos obtidos no caso de álcoois devem ser interpretados com cautela, devido ao risco de não serem efetivamente positivos em todos os casos que o indiciem.

Quando utilizado para identificar produtos químicos indutores de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU), a exatidão global do método ICE é de 86 % (120/140), a taxa de falsos positivos é de 6 % (7/113) e a taxa de falsos negativos é de 48 % (13/27), comparativamente aos dados obtidos pelo método de ensaio ocular *in vivo* no coelho, classificados de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU (4) (5).

Também pode recorrer-se ao método ICE para identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves no sistema de classificação GHS da ONU (4). As autoridades reguladoras competentes devem ser consultadas antes de se utilizar o método ICE numa abordagem ascendente no âmbito de outros sistemas de classificação. Pode recorrer-se a este método de ensaio para todos os tipos de produtos químicos, aceitando que um resultado negativo constitua razão para não classificar o produto químico em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves. Todavia, um dos resultados da base de dados de validação indicia que as tintas antivegetativas com solventes orgânicos podem ser subavaliadas (5).

Quando utilizado para identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, a exatidão global do método ICE é de 82 % (125/152), a taxa de falsos positivos é de 33 % (26/79) e a taxa de falsos negativos é de 1 % (1/73), comparativamente aos dados obtidos pelo método de ensaio ocular *in vivo* no coelho, classificados de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU (4) (5). Excluindo da base de dados determinados produtos químicos de certas classes (tintas antivegetativas com solventes orgânicos), a exatidão do método ICE é de 83 % (123/149), a taxa de falsos positivos é de 33 % (26/78) e a taxa de falsos negativos é de 0 % (0/71), no sistema de classificação GHS da ONU (4) (5).

Devido ao número considerável de produtos químicos da categoria 1 do sistema GHS da ONU subclassificados na categoria 2, 2A ou 2B do mesmo sistema e de produtos químicos de «nenhuma categoria» do sistema GHS sobreclassificados na categoria 2, 2A ou 2B desse sistema, não se recomenda o recurso ao método ICE na identificação de produtos químicos que devam ser classificados de irritantes oculares (categoria 2 ou 2A do sistema GHS da ONU) nem de produtos químicos que devam ser classificados de irritantes oculares moderados (categoria 2B do sistema GHS da ONU). Nesses casos, podem ser necessários ensaios complementares por outro método, que seja adequado.

Na manipulação de olhos de frango devem seguir-se as regras e procedimentos estabelecidos no laboratório para a manipulação de matérias de origem humana ou animal (tecidos, fluidos biológicos etc.). Recomenda-se a aplicação das precauções gerais inerentes à prática laboratorial (16).

Embora não tenha em conta as lesões na conjuntiva nem na íris, avaliadas pelo método da irritação ocular no coelho, o método ICE tem em conta os efeitos na córnea, fator principal do sistema de classificação GHS da ONU em função dos efeitos *in vivo*. Por outro lado, embora a reversibilidade das lesões da córnea não possa ser avaliada *per se* no método ICE, propôs-se, com base em estudos oculares no coelho, a possibilidade de se recorrer à avaliação da profundidade inicial da lesão da córnea para identificar alguns tipos de efeitos irreversíveis (17). São necessários mais estudos científicos para, nomeadamente, se compreender a ocorrência de efeitos irreversíveis não associados a lesões iniciais importantes. Por último, o método ICE não permite avaliar o potencial de toxicidade sistémica associado à exposição ocular.

Este método de ensaio será atualizado periodicamente em função de novos dados e informações. Por exemplo, a histopatologia é potencialmente útil quando se necessita de uma caracterização mais completa das lesões da córnea. Para ajuizar dessa possibilidade, incentivam-se os utilizadores a preservarem os olhos e a prepararem espécimes histopatológicos que possam ser utilizados na constituição de uma base de dados e na definição de critérios de decisão utilizáveis para melhorar a exatidão deste método de ensaio. A OCDE elaborou um documento de orientações relativas à utilização de métodos de ensaio de toxicidade ocular *in vitro*, o qual descreve pormenorizadamente as colheitas histopatológicas e diz onde apresentar os espécimes e dados histopatológicos (8).

Os laboratórios que comecem a utilizar este método de ensaio devem recorrer aos produtos químicos para demonstração de competência técnica recomendados no apêndice 2. Antes de apresentarem dados obtidos pelo método ICE para efeitos da classificação normativa de perigosidade, os laboratórios podem recorrer aos referidos produtos químicos para demonstrar a sua competência técnica na execução deste método.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O método ICE assenta num modelo organotípico de manutenção de olhos de frango *in vitro* por um período curto. Neste método de ensaio, as lesões provocadas pelo produto químico em estudo são avaliadas por determinação do edema e da opacidade da córnea, bem como da retenção de fluoresceína na córnea. A avaliação dos dois últimos parâmetros é qualitativa, enquanto a análise do edema da córnea é quantitativa. Converte-se cada medida numa pontuação quantitativa, utilizada para calcular um índice global de irritação, ou atribui-se a cada medida uma categoria qualitativa, utilizada para estabelecer uma classificação de perigosidade ocular *in vitro* (categoria 1 ou «não-classificado» no sistema GHS da ONU). Consoante o resultado obtido, pode em seguida prever-se com base nele se o produto químico em estudo é potencialmente causador de lesões oculares graves *in vivo* ou se não necessita de ser classificado em termos de perigosidade ocular (ver «Critérios de decisão»). Porém, não é possível atribuir nenhuma classificação aos produtos químicos que o método ICE não permita prever se são potencialmente causadores de lesões oculares graves ou se não necessitam de ser classificados (ver o ponto 11).

Origem e idade dos olhos de frango

Os olhos utilizados neste ensaio são normalmente colhidos em matadouros, de frangos abatidos para consumo humano, eliminando assim a necessidade de animais de laboratório. Só podem ser utilizados olhos de animais saudáveis considerados adequados para entrarem na cadeia alimentar humana.

Embora não se tenha efetuado nenhum estudo controlado destinado a avaliar a idade ótima dos frangos, as aves utilizadas neste método de ensaio têm habitualmente a idade e o peso dos frangos normalmente abatidos nos matadouros de aves de capoeira (aproximadamente 7 semanas e 1,5 a 2,5 kg).

Colheita e transporte dos olhos para o laboratório

Imediatamente após o atordoamento dos frangos, em geral por descarga elétrica, e incisão no pescoço para sangramento, corta-se-lhes a cabeça. A origem dos frangos deve ser próxima do laboratório, para que as cabeças possam ser transferidas do matadouro para lá com suficiente rapidez, a fim de minimizar a deterioração e/ou contaminações bacteriológicas. Para cumprir os critérios de aceitação do ensaio, o intervalo entre a colheita das cabeças de frango e a colocação dos olhos na câmara de superfusão depois de desorbitados deve ser mínimo (normalmente duas horas). Os olhos utilizados num ensaio devem ser todos do mesmo grupo de colheita num determinado dia.

Os olhos são dissecados no laboratório, pelo que se transportam as cabeças intactas do matadouro em caixas de plástico, à temperatura ambiente (normalmente entre 18 °C e 25 °C), humedecidas com papel absorvente embebido em solução salina isotónica.

CrITÉRIOS de seleção e número dos olhos utilizados no método ICE

Rejeitam-se os olhos que, depois de desorbitados, apresentem uma linha de base elevada de reação cromática à fluoresceína (> 0,5) ou de pontuação de opacidade da córnea (> 0,5).

Cada grupo de tratamento e a amostra de controlo positiva ensaiada em paralelo é constituído por um mínimo de três olhos. O grupo de controlo negativo ou a amostra de controlo do solvente (caso se utilize um solvente que não seja a solução salina) é constituído por, pelo menos, um olho.

No caso das matérias sólidas cujo resultado seja «nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU, recomenda-se um segundo ensaio de três olhos, para confirmar ou infirmar o resultado negativo obtido.

PROTOCOLO DE ENSAIO

Preparação dos olhos

Excisam-se cautelosamente as pálpebras, tomando as precauções necessárias para não danificar a córnea. Para avaliar a integridade desta, deita-se na sua superfície uma gota de solução a 2 % (m/v) de fluoresceína de sódio, espera-se alguns segundos e lava-se com solução salina isotónica. Para garantir que a córnea está isenta de lesões (retenção de fluoresceína e pontuação de opacidade da córnea $\leq 0,5$), os olhos tratados com fluoresceína são em seguida examinados por meio de um microscópio equipado com lâmpada de fenda.

Se o olho não apresentar lesões, diseca-se completamente do crânio, tomando as precauções necessárias para não danificar a córnea. Para retirar o globo ocular da órbita, prende-se firmemente a membrana nictante com uma pinça cirúrgica e cortam-se os músculos oculares com uma tesoura encurvada de pontas rombas. É importante evitar lesões da córnea provocadas por pressão excessiva (ditas artefactos de compressão).

Ao remover o olho da órbita, deve deixar-se agarrada àquele uma porção visível do nervo ótico. Uma vez desorbitado, coloca-se o olho numa compressa absorvente e cortam-se a membrana nictante e os restantes tecidos de ligação.

Coloca-se o olho desorbitado num suporte de aço inoxidável, com a córnea na vertical, e transfere-se o conjunto para uma das câmaras do aparelho de superfusão (18). Colocam-se os suportes no aparelho de superfusão de modo tal que a solução salina isotónica goteje sobre toda a córnea (3 a 4 gotas por minuto ou 0,1 a 0,15 ml/minuto). As câmaras do aparelho de superfusão devem ser termostatizadas a $32 \pm 1,5$ °C. Apresenta-se no apêndice 3 um diagrama de um aparelho de superfusão típico e dos suportes oculares, que podem ser adquiridos no comércio ou construídos. O aparelho pode ser modificado para corresponder às necessidades do laboratório (por exemplo para nele ser introduzida outra quantidade de olhos).

Depois de colocados no aparelho de superfusão, examinam-se novamente os olhos ao microscópio com lâmpada de fenda, para garantir que não foram danificados durante a dissecação. Mede-se também nessa ocasião a espessura da córnea no seu ápice, utilizando o dispositivo de medição de profundidade incorporado no microscópio. Devem ser substituídos os olhos que apresentem: i) pontuação de retenção de fluoresceína > 0,5; ii) opacidade da córnea > 0,5; iii) qualquer outro sinal de dano. Rejeitam-se ainda os olhos que, não tendo sido rejeitados com base em nenhum destes critérios, apresentem uma espessura de córnea com desvio superior a 10 % em relação ao valor médio correspondente a todos os olhos. Alertam-se os utilizadores para o facto de os microscópios com lâmpada de fenda poderem dar resultados diferentes para as medições de espessura da córnea se a regulação da fenda for outra. A largura da fenda deve ser regulada a 0,095 mm.

Os olhos examinados e aprovados são incubados durante 45 a 60 minutos, para estabelecer o equilíbrio com o sistema de ensaio antes da aplicação do produto químico em estudo. Terminado o período previsto para se atingir o equilíbrio, regista-se como linha de base (tempo = 0) uma determinação de referência «zero» de opacidade e de espessura da córnea. A pontuação de retenção de fluoresceína determinada na dissecação é utilizada para linha de base deste parâmetro.

Aplicação do produto químico em estudo

Imediatamente após as determinações de referência «zero» remove-se o olho (mantendo-o no suporte) do aparelho de superfusão e coloca-se na horizontal, aplicando-se na córnea o produto químico em estudo.

Os produtos químicos líquidos são normalmente ensaiados sem diluição, mas, se for considerado necessário (devido ao modo como o estudo foi concebido, por exemplo), podem ser diluídos. O solvente preferido para diluir os produtos químicos é soro fisiológico. Embora possam utilizar-se outros solventes, em condições controladas, será necessário demonstrar que são adequados.

Os produtos químicos em estudo líquidos aplicam-se na córnea de modo a cobri-la uniformemente. O volume normal é 0,03 ml.

Se isso for realizável, os produtos químicos sólidos devem ser moídos o máximo possível com um pilão num almofariz, ou com um dispositivo de moagem comparável. O pó é depois aplicado na córnea de modo a cobrir uniformemente a superfície desta com o produto químico em estudo. A quantidade normal é 0,03 g.

Mantém-se o produto químico (líquido ou sólido) aplicado na córnea durante 10 segundos e, em seguida, lava-se o olho com solução salina isotónica à temperatura ambiente (cerca de 20 ml), para remover o produto. Recoloca-se em seguida o olho (no seu suporte) no aparelho de superfusão, na posição vertical original. Em caso de necessidade, podem ser feitas lavagens adicionais após a aplicação durante 10 segundos e ulteriormente (por exemplo caso se detetem na córnea resíduos do produto químico em estudo). Em geral, a quantidade de solução salina adicionalmente utilizada em lavagens não é demasiado importante, mas é-o a observação da aderência do produto químico à córnea.

Produtos químicos de controlo

Em cada ensaio são ensaiadas em paralelo amostras de controlo positivas e negativas (ou do solvente/excipiente).

Ao ensaiar pelo método ICE líquidos a 100 % ou sólidos, utiliza-se soro fisiológico como amostra de controlo negativa ensaiada em paralelo, para possibilitar a deteção de alterações inespecíficas do sistema de ensaio e evitar que as condições do ensaio provoquem, inadequadamente, uma reação de irritação.

Ao ensaiar líquidos diluídos, o método compreende o ensaio em paralelo de um grupo de amostras de controlo do excipiente/solvente, para possibilitar a deteção de alterações inespecíficas do sistema de ensaio e evitar que as condições do ensaio provoquem, inadequadamente, uma reação de irritação. Como se referiu no ponto 31, só podem utilizar-se solventes/excipientes que, comprovadamente, não tenham efeitos adversos no sistema de ensaio.

Para verificar se é induzida uma reação adequada, inclui-se em cada ensaio um irritante ocular conhecido, que servirá de amostra de controlo positiva ensaiada em paralelo. Como o ensaio ICE é utilizado neste método para identificar efeitos corrosivos ou irritantes severos, a amostra de controlo positiva deve ser um produto químico de referência que induza uma reação severa ao aplicar-se-lhe o método. Porém, para que possa determinar-se a variabilidade, ao longo do tempo, da reação à referida amostra de controlo positiva, essa reação não deve ser excessivamente forte. Os dados *in vitro* de que se disponha para amostras de controlo positivas devem ser suficientes para calcular um intervalo aceitável, estatisticamente definido, para essas amostras de controlo. Caso não se disponha de dados históricos adequados do método ICE para uma determinada amostra de controlo positiva, pode ser necessário efetuar estudos para obter tais informações.

Como amostras de controlo positivas para produtos químicos líquidos em estudo, podem ser utilizados, por exemplo, ácido acético a 10 % ou cloreto de benzalcónio a 5 %. Como amostras de controlo positivas para produtos químicos sólidos em estudo, podem ser utilizados, por exemplo, hidróxido de sódio ou imidazole.

Os produtos químicos de referência são úteis para avaliar o potencial de irritação ocular de produtos químicos desconhecidos de uma determinada classe química ou classe de produtos, ou para avaliar o potencial de irritação relativo de um irritante ocular numa determinada gama de reações de irritação.

Parâmetros medidos

Avaliam-se as córneas tratadas antes do tratamento e decorridos 30, 75, 120, 180 e 240 minutos (± 5 minutos) após a lavagem subsequente ao tratamento. Obtém-se, assim, um número adequado de determinações no período de quatro horas que se segue ao tratamento, garantindo ainda um intervalo entre determinações suficiente para a realização das observações necessárias em todos os olhos.

Os parâmetros avaliados são a opacidade e o edema da córnea, a retenção de fluoresceína na córnea e efeitos morfológicos na córnea (picado epitelial ou perda de epitélio, por exemplo). Com exceção da retenção de fluoresceína (que só é determinada antes do tratamento e 30 minutos após a exposição ao produto químico em estudo), todos estes parâmetros são determinados nos tempos acima referidos.

Recomenda-se o recurso a fotografias para documentar a opacidade da córnea, a retenção de fluoresceína na córnea, os efeitos morfológicos e, se for efetuada, a histopatologia.

Recomenda-se aos utilizadores que, depois do último exame, iniciado 4 horas após o tratamento, conservem os olhos num fixador adequado (por exemplo formol tamponado neutro), para eventual exame histopatológico (mais elementos no ponto 14 e na referência 8).

Determina-se o edema da córnea medindo a espessura da córnea com o paquímetro ótico do microscópio com lâmpada de fenda. O resultado é expresso em percentagem e é calculado a partir das determinações de espessura da córnea, por meio da seguinte fórmula:

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

Calcula-se a média percentual dos edemas da córnea de todos os olhos ensaiados em cada instante «t» considerado. Com base na pontuação média mais elevada de edema da córnea, observada em qualquer dos instantes considerados, atribui-se, em seguida, a pontuação global desta categoria ao produto químico em estudo (ver o ponto 51).

Avalia-se a opacidade da córnea atribuindo uma pontuação, como indica o quadro 1, à superfície que se encontre mais densamente opacificada em cada córnea. Calcula-se o valor médio de opacidade da córnea de todos os olhos ensaiados em cada instante considerado. Com base na pontuação média mais elevada de opacidade da córnea, observada em qualquer dos instantes considerados, atribui-se, em seguida, a pontuação global desta categoria ao produto químico em estudo (ver o ponto 51).

Quadro 1

Pontuações de opacidade da córnea.

Pontuação	Observações
0	Ausência de opacidade
0,5	Opacidade muito ligeira
1	Zonas dispersas ou difusas; detalhes da íris claramente visíveis
2	Zona translúcida claramente discernível; detalhes da íris ligeiramente obscurecidos
3	Forte opacidade da córnea; nenhum detalhe da íris visível; tamanho da pupila dificilmente discernível
4	Opacidade completa da córnea; íris invisível

A retenção de fluoresceína só é avaliada (como indica o quadro 2) quando da observação que tem lugar decorridos 30 minutos. Calcula-se em seguida o valor médio da retenção de fluoresceína de todos os olhos ensaiados correspondente à observação efetuada aos 30 minutos, utilizando-se esse valor para atribuir uma pontuação global desta categoria ao produto químico em estudo (ver o ponto 51).

Quadro 2

Pontuações de retenção de fluoresceína.

Pontuação	Observações
0	Ausência de retenção de fluoresceína
0,5	Número muito reduzido de células isoladas coradas
1	Células isoladas coradas dispersas pela zona tratada da córnea
2	Focos ou confluência densa de células isoladas coradas
3	Retenção de fluoresceína em zonas extensas confluentes da córnea

Incluem-se nos efeitos morfológicos o «picado» das células epiteliais da córnea, a «perda» de epitélio, a «aspereza» da superfície da córnea e a «colagem» do produto químico em estudo à córnea. Estes efeitos podem ser concomitantes e de intensidade variável. A sua classificação é subjetiva e depende da interpretação do investigador.

DADOS E RELATÓRIOS**Avaliação dos dados**

Avaliam-se separadamente os resultados de opacidade da córnea, edema da córnea e retenção de fluoresceína na córnea para determinar a classe correspondente a cada um destes parâmetros pelo método ICE. Combinam-se depois essas classes de modo a obter a classificação de irritação correspondente ao produto químico em estudo.

Critérios de decisão

Uma vez efetuada a avaliação de cada parâmetro, podem atribuir-se as classes ICE com base em intervalos preestabelecidos. Estabelece-se a correspondência entre os valores de edema da córnea (quadro 3), opacidade da córnea (quadro 4) e retenção de fluoresceína na córnea (quadro 5) e quatro classes ICE, de acordo com as escalas a seguir indicadas. Importa referir que as pontuações de edema da córnea indicadas no quadro 3 só são aplicáveis se a espessura for medida por meio de um microscópio com lâmpada de fenda (por exemplo Haag-Streit BP900) dotado do dispositivo n.º 1 de medição de profundidade e com a largura da fenda regulada a 9½, correspondente a 0,095 mm. Alertam-se os utilizadores para o facto de os microscópios com lâmpada de fenda poderem dar resultados diferentes nas medições de espessura da córnea se a regulação da fenda for outra.

Quadro 3

Critérios de classificação ICE de edema da córnea.

Valor médio de edema da córnea (%) (*)	Classe ICE
0 a 5	I
> 5-12	II

Valor médio de edema da córnea (%) (*)	Classe ICE
> 12-18 (> 75 minutos após o tratamento)	II
> 12-18 ($\leq$ 75 minutos após o tratamento)	III
> 18-26	III
> 26-32 (> 75 minutos após o tratamento)	III
> 26-32 ($\leq$ 75 minutos após o tratamento)	IV
> 32	IV

(*) Pontuação média mais elevada observada em qualquer dos instantes considerados.

Quadro 4

Crítérios de classificação ICE de opacidade.

Valor máximo de pontuação média de opacidade (*)	Classe ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Valor máximo da pontuação média observado em qualquer dos instantes considerados (com base nas pontuações de opacidade definidas no quadro 1).

Quadro 5

Crítérios de classificação ICE de retenção média de fluoresceína.

Valor médio da pontuação de retenção de fluoresceína 30 minutos após o tratamento (*)	Classe ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Com base nas pontuações definidas no quadro 2.

Para determinar a classificação *in vitro* do produto químico em estudo, utiliza-se o quadro 6 para estabelecer a correspondência entre a classificação GHS e a combinação das categorias obtidas para o edema da córnea, a opacidade da córnea e a retenção de fluoresceína na córnea.

Quadro 6

Classificações globais *in vitro*

Classificação no sistema GHS da ONU	Combinações dos três parâmetros medidos
Nenhuma categoria	3 × I 2 × I, 1 × II
Previsão impossível	Outras combinações
Categoria 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Opacidade da córnea ≥ 3 aos 30 minutos (em pelo menos 2 olhos) Opacidade da córnea = 4 em qualquer momento (em pelo menos 2 olhos) Perda substancial de epitélio (em pelo menos 1 olho)
(*) Combinações menos prováveis.	

CrITÉRIOS de aceitação do estudo

Considera-se o ensaio aceitável se às amostras de controlo negativas ou do excipiente/solvente ensaiadas em paralelo e às amostras de controlo positivas ensaiadas em paralelo corresponderem as classificações do sistema GHS «não classificado» e «categoria 1» respetivamente.

Relatório do ensaio

O relatório do ensaio deve incluir os elementos seguintes que sejam pertinentes na realização do estudo:

Produtos químicos em estudo e de controlo

- Denominação(ões) química(s), como a denominação estrutural utilizada pelo *Chemical Abstracts Service* (CAS), seguida de outras denominações, se existirem;
- Número de registo CAS, se conhecido;
- Grau de pureza e composição dos produtos químicos em estudo/de controlo (em percentagem ponderal), se conhecidos;
- Propriedades físico-químicas (por exemplo: estado físico, volatilidade, pH, estabilidade, classe química, hidrossolubilidade) relevantes para a realização do estudo;
- Pré-tratamento dos produtos químicos em estudo/de controlo, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Estabilidade, se conhecida.

Informações relativas ao patrocinador e ao laboratório

- Nome e endereço do patrocinador, do laboratório e do diretor do estudo;
- Indicação da origem dos olhos (por exemplo a instalação na qual foram colhidos).

Condições do método de ensaio

- Descrição do sistema de ensaio utilizado;

- Microscópio com lâmpada de fenda utilizado (modelo etc.) e regulações desse instrumento;
- Referência a resultados históricos de amostras de controlo negativas e positivas e, se for aplicável, referência a dados históricos comprovativos dos intervalos aceitáveis das amostras de referência de controlo ensaiadas em paralelo;
- Processo utilizado para garantir a integridade (exatidão e fiabilidade) do método de ensaio ao longo do tempo (por exemplo: ensaio periódico dos produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica).

Colheita e preparação dos olhos

- Idade e peso do animal dador e, se conhecidas, outras especificidades dos animais nos quais os olhos foram colhidos (sexo e estirpe, por exemplo).
- Condições de armazenamento e de transporte dos olhos (por exemplo: data-hora da colheita dos olhos, intervalo entre a colheita das cabeças de frango e a colocação dos olhos na câmara de superfusão depois de desorbitados);
- Preparação e montagem dos olhos, incluindo informações sobre a qualidade dos mesmos, a temperatura das câmaras dos olhos e os critérios de seleção dos olhos utilizados no ensaio.

Protocolo de ensaio

- Número de replicados utilizados;
- Identificação das amostras de controlo negativa e positiva utilizadas (e das amostras de controlo de referência e do solvente, se for caso disso);
- Dose e modo de aplicação do produto químico em estudo e tempo de exposição a ele;
- Instantes de observação (antes e depois do tratamento);
- Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;
- Descrição dos critérios de aceitação do estudo utilizados;
- Descrição de eventuais modificações ao protocolo do ensaio.

Resultados

- Quadros das pontuações de edema da córnea, de opacidade da córnea e de retenção de fluoresceína obtidas para cada olho em cada instante de observação, incluindo as pontuações médias de todos os olhos ensaiados em cada instante de observação;
- Valor máximo da pontuação média observada (em qualquer instante de observação) para o edema da córnea, a opacidade da córnea e a retenção de fluoresceína e as classes ICE correspondentes;
- Descrição de outros efeitos eventualmente observados;
- Classificação *in vitro* segundo o sistema GHS da ONU;
- Se for caso disso, fotografias dos olhos.

Discussão dos resultados

Conclusões

REFERÊNCIAS

- 1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report — *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponível em: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm.
- 2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Disponível em: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.

- 3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
 - 4) Nações Unidas (ONU) (2011). Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS), 2.^a edição revista, ONU Nova Iorque e Genebra, 2011. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.
 - 5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment, No. 188 (parte 1 e parte 2). OCDE, Paris.
 - 6) Capítulo B.5 deste anexo, «Irritação/corrosão ocular agudas»
 - 7) Scott, L., Eskes, C., Hoffman, S., Adriaens, E., Alepee, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Hamernik, K., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., Mcnamee, P., Osborn, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielmann, H., Stokes, W., Trouba, K., Vassallo, M., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. *Toxicology In Vitro*, 24, 1-9.
 - 8) OCDE (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. OCDE, Paris.
 - 9) ICCVAM (2006). Background review document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponível em: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm.
 - 10) Prinsen, M.K., Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.*, 31:69-76.
 - 11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13 pp. Disponível em: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>.
 - 12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H., Spielmann, H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro*, 9:871-929.
 - 13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.*, 34:291-296.
 - 14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P., Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.*, 35:23-37.
 - 15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology In Vitro*, 20,78-81.
 - 16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>.
 - 17) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.*, 36:106-117.
 - 18) Burton, A.B.G., York, M., Lawrence, R. S. (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 19, 471-480.
-

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida da eficiência do método e um dos aspetos da «adequação». Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos do método de ensaio.

Produto químico de referência: Produto químico utilizado como padrão de comparação com o produto químico em estudo. Deve ter as seguintes propriedades: i) origem ou origens uniformes e fiáveis; ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de produtos químicos em estudo; iii) características físico-químicas conhecidas; iv) disponibilidade de dados sobre os efeitos conhecidos; v) potência conhecida na gama de reação pretendida.

Abordagem ascendente: Metodologia por etapas utilizada para produtos químicos que se pense não necessitarem de ser classificados em termos de irritação ocular ou de lesões oculares graves; inicia-se com a determinação de produtos químicos que não careçam de classificação (resultado negativo) a partir de outros produtos químicos (resultado positivo).

Produto químico: Substância ou mistura.

Córnea: Parte anterior transparente do globo ocular que recobre a íris e a pupila e deixa passar a luz para o interior.

Opacidade da córnea: Medida do grau de opacidade da córnea depois de exposta ao produto químico em estudo. Um aumento de opacidade da córnea é indicador de lesão da córnea.

Edema da córnea: Medida objetiva, no ensaio ICE, da dilatação da córnea após exposição ao produto químico em estudo. É expressa em percentagem e calculada em relação às medidas da linha de base de espessura da córnea efetuadas antes da aplicação do produto químico em estudo. A espessura é registada a intervalos regulares após exposição ao produto químico em estudo no ensaio ICE. O grau de edema da córnea é um indicador do grau de lesão da córnea.

Irritação ocular: Alterações oculares em consequência da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, totalmente reversíveis nos 21 dias após a aplicação. Este termo e «efeitos oculares reversíveis» ou «categoria 2 do sistema GHS da ONU» (4) são utilizados indistintamente.

Taxa de falsos negativos: Proporção dos produtos químicos positivos que o método de ensaio considera, erradamente, negativos. É um dos indicadores da eficiência dos métodos de ensaio.

Taxa de falsos positivos: Proporção dos produtos químicos negativos que o método de ensaio considera, erradamente, positivos. É um dos indicadores da eficiência dos métodos de ensaio.

Retenção de fluoresceína: Medida subjetiva, no ensaio ICE, da proporção de fluoresceína de sódio que, após exposição à substância em estudo, é retida pelas células epiteliais da córnea. O grau de retenção da fluoresceína é um indicador do grau de lesão do epitélio da córnea.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente ou de uma situação, suscetível de causar efeitos adversos num organismo, sistema ou (sub)população que seja exposto ao agente em causa.

Efeitos oculares irreversíveis: Ver «Lesões oculares graves» e «Categoria 1 do sistema GHS da ONU».

Mistura: Mistura ou solução constituída por duas ou mais substâncias que nela não reagem (4).

Amostra de controlo negativa: Replicado não-tratado que contém todos os componentes do sistema de ensaio. Esta amostra é ensaiada juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para determinar se o solvente interage com o sistema de ensaio.

Não-classificado: Substâncias não classificadas em termos de irritação ocular (categoria 2 do sistema GHS da ONU) nem de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU). Designação utilizada indistintamente com a classificação «nenhuma categoria no sistema GHS da ONU».

Amostra de controlo positiva: Replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com um produto químico que comprovadamente induz reação positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade, ao longo do tempo, da reação a esta amostra de controlo, essa reação não deve ser excessivamente forte.

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial, bem como da repetibilidade intralaboratorial.

Efeitos oculares reversíveis: Ver «Irritação ocular» e «Categoria 2 do sistema GHS da ONU».

Lesões oculares graves: Lesão do tecido ocular ou degradação grave da visão em consequência da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação. Este termo e «efeitos oculares irreversíveis» ou «categoria 1 do sistema GHS da ONU» (4) são utilizados indistintamente.

Microscópio com lâmpada de fenda: Instrumento utilizado para examinar diretamente uma imagem estereoscópica saliente do olho com a ampliação de um microscópio binocular. No método de ensaio ICE, este instrumento é utilizado para observar as estruturas anteriores dos olhos de frango e para medir objetivamente a espessura da córnea com um dispositivo de medição de profundidade incorporado.

Amostra de controlo do solvente/excipiente: Amostra não-tratada que contém todos os componentes do sistema de ensaio, incluindo o solvente ou excipiente, e é ensaiada, juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para estabelecer a linha de base de reação para as amostras tratadas com o produto químico em estudo, dissolvido no mesmo solvente ou excipiente. Quando ensaiada em paralelo com uma amostra de controlo negativa, esta amostra também permite determinar se o solvente ou excipiente interage com o sistema de ensaio.

Substância: Elemento químico ou composto de um elemento químico, no estado natural ou obtido por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo solventes que possam ser separados sem afetar a estabilidade da substância nem lhe modificar a composição (4).

Agente tensioativo: Substância, como um detergente, capaz de reduzir a tensão superficial de líquidos, permitindo-lhes formar espumas ou penetrar em sólidos; igualmente designado por «agente molhante».

Abordagem descendente: Metodologia por etapas utilizada para produtos químicos que se suspeite causarem lesões oculares graves; inicia-se com a determinação de produtos químicos que induzam lesões oculares graves (resultado positivo) a partir de outros produtos químicos (resultado negativo).

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

Estratégia de ensaio sequencial por etapas: Estratégia sequencial de ensaio em que, seguindo uma ordem estabelecida, se avalia toda a informação disponível sobre o produto químico em estudo, por um processo baseado na ponderação da suficiência da prova em cada etapa, com o objetivo de determinar se há informação suficiente para uma decisão de classificação de perigosidade antes de passar à etapa seguinte. Se a informação existente possibilitar a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, não serão necessários mais ensaios. Se a informação existente não possibilitar a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, procede-se a uma série de ensaios sequenciais em animais até ser possível atribuir uma classificação inequívoca.

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS): Sistema (designado em inglês por *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência etc.) e do ambiente (4).

Categoria 1 do sistema GHS da ONU: Ver «Lesões oculares graves» e/ou «Efeitos oculares irreversíveis».

Categoria 2 do sistema GHS da ONU: Ver «Irritação ocular» e/ou «Efeitos oculares reversíveis».

Nenhuma categoria no sistema GHS da ONU: Substâncias que não preenchem os requisitos da classificação nas categorias 1 ou 2 (2A ou 2B) do sistema GHS da ONU. Este termo e o termo «não-classificado» são utilizados indistintamente.

Método de ensaio validado: Método de ensaio relativamente ao qual foram concluídos estudos de validação com vista a determinar a sua adequação (incluída a exatidão) e a sua fiabilidade para um determinado fim. Importa referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exato e fiável para se considerar aceitável para o fim pretendido.

Ponderação da suficiência da prova: Processo que consiste em ponderar os pontos fortes e os pontos fracos dos vários elementos de informação para tirar conclusões fundamentadas sobre o potencial de perigosidade do produto químico.

Apêndice 2

PRODUTOS QUÍMICOS RECOMENDADOS PARA DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA TÉCNICA NO MÉTODO DE ENSAIO EM OLHOS DE FRANGO ISOLADOS (ICE)

Antes de um método de ensaio conforme ao presente método passar a ser utilizado por rotina, os laboratórios devem comprovar a sua competência técnica identificando corretamente a classificação de perigosidade ocular dos 13 produtos químicos recomendados no quadro 1. Estes produtos químicos foram selecionados de modo a representarem a gama de reações de perigo ocular obtidas no ensaio ocular *in vivo* no coelho (TG 405) (17), com base no sistema de classificação GHS da ONU (categorias 1, 2A, 2B ou nenhuma categoria no sistema GHS da ONU) (4) (6). Outros critérios de seleção foram a disponibilidade do produto químico no comércio, a existência de dados de referência *in vivo* de alta qualidade e a existência de dados *in vitro* de alta qualidade pelo método ICE. O *Streamlined Summary Document* (5) e os *Background Review Documents* do ICCVAM relativos ao método de ensaio ICE (9) contêm dados de referência.

Quadro 1

Produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica no método ICE

Produto químico	N.º CAS (CASRN)	Classe química ⁽¹⁾	Fase	Classificação <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Classificação <i>in vitro</i> ⁽³⁾
Cloreto de benzalcónio (5 %)	8001-54-5	Sal de amónio quaternário	Líquida	Categoria 1	Categoria 1
Clorexidina	55-56-1	Amina, amidina	Sólida	Categoria 1	Categoria 1
Ácido dibenzoil-L-tartárico	2743-38-6	Ácido carboxílico, éster	Sólida	Categoria 1	Categoria 1
Imidazole	288-32-4	Composto heterocíclico	Sólida	Categoria 1	Categoria 1
Ácido tricloroacético (30 %)	76-03-9	Ácido carboxílico	Líquida	Categoria 1	Categoria 1
Cloreto de 2,6-diclorobenzoílo	4659-45-4	Halogeneto de acilo	Líquida	Categoria 2A	Não é possível nenhuma previsão ⁽⁴⁾
Nitrato de amónio	6484-52-2	Sal inorgânico	Sólida	Categoria 2A ⁽⁵⁾	Não são possíveis previsões ⁽⁴⁾
2-Metilacetoacetato de etilo	609-14-3	Cetona, Éster	Líquida	Categoria 2 B	Não são possíveis previsões ⁽⁴⁾
Sulfóxido de dimetilo	67-68-5	Composto orgânico sulfurado	Líquida	Nenhuma categoria	Nenhuma categoria
Glicerol	56-81-5	Álcool	Líquida	Nenhuma categoria	Nenhuma categoria (limite)

Produto químico	N.º CAS (CASRN)	Classe química ⁽¹⁾	Fase	Classificação <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Classificação <i>in vitro</i> ⁽³⁾
Metilciclopentano	96-37-7	Hidrocarboneto (cíclico)	Líquida	Nenhuma categoria	Nenhuma categoria
<i>n</i> -Hexano	110-54-3	Hidrocarboneto (acíclico)	Líquida	Nenhuma categoria	Nenhuma categoria
Triacetina	102-76-1	Lípido	Líquida	Não classificado	Nenhuma categoria

Abreviaturas: CASRN = Número de registo do *Chemical Abstracts Service*.

⁽¹⁾ Os produtos químicos foram inseridos em classes químicas segundo um sistema normalizado, com base nos *Medical Subject Headings* («classificadores de temas médicos», MeSH) da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos da América (<http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Com base nos resultados do ensaio ocular *in vivo* no coelho (TG 405 da OCDE) e no sistema GHS da ONU (4) (6).

⁽³⁾ Com base nos resultados obtidos pelo método ICE, como se refere no quadro 6.

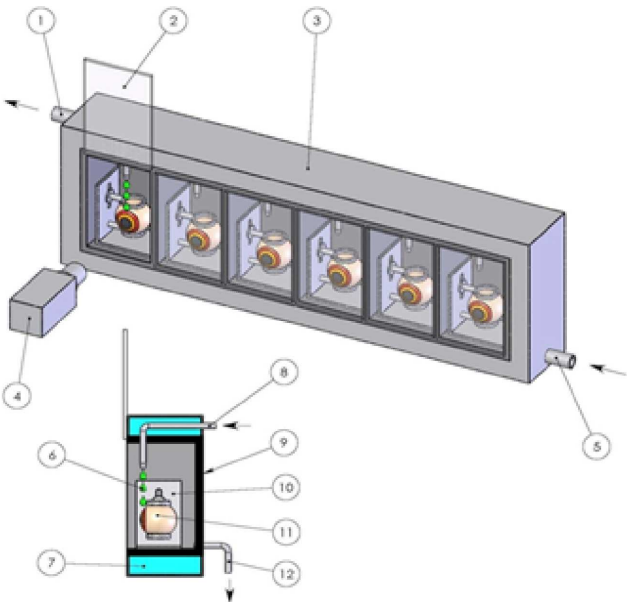
⁽⁴⁾ Combinação de pontuações obtidas pelo método ICE diversa das indicadas no quadro 6 para as classificações «nenhuma categoria» e «categoria 1» do sistema GHS da ONU (ver o quadro 6).

⁽⁵⁾ A classificação na categoria 2A ou 2B depende da interpretação do critério do sistema GHS da ONU para distinguir estas categorias: se para a classificação 2A poder ser atribuída é necessário que 1 em 3 ou que 2 em 3 animais exibam efeitos ao sétimo dia. O estudo *in vivo* incidiu em 3 animais. Todos os animais recuperaram para a pontuação 0 ao sétimo dia ou antes, em todos os parâmetros, exceto a vermelhidão da conjuntiva num dos animais. Ao sétimo dia, este animal apresentava vermelhidão da conjuntiva com pontuação 1; ao décimo dia, estava totalmente recuperado.

Apêndice 3

DIAGRAMAS DOS SUPORTES OCULARES E DO APARELHO DE SUPERFUSÃO PARA O MÉTODO ICE

(Ver em Burton et al. (18) uma descrição genérica dos suportes oculares e do aparelho de superfusão para o método ICE)



CROSS SECTION COMPARTMENT

EYE HOLDER

Item	Descrição	Item	Descrição
1	Saída de água tépida	9	Compartimento
2	Portinhola deslizante	10	Suporte ocular
3	Aparelho de superfusão	11	Olho de frango
4	Instrumento de medição ótica	12	Saída de solução salina
5	Entrada de água tépida	13	Parafuso de regulação
6	Solução salina	14	Braço superior regulável
7	Água tépida	15	Braço inferior fixo»
8	Entrada de solução salina		

14) Na parte B, o capítulo B.49 é substituído pelo seguinte texto:

«B.49 Ensaio *in vitro* de micronúcleos em células de mamíferos

INTRODUÇÃO

Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline 487* (2016) da OCDE. Faz parte de uma série de métodos de ensaio sobre toxicologia genética. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente efetuadas às orientações da OCDE nesse domínio (1).

O ensaio *in vitro* de micronúcleos é um ensaio de genotoxicidade para a deteção de micronúcleos no citoplasma de células em interfase. Os micronúcleos podem provir de fragmentos cromossómicos acêntricos (ou seja, sem centrómero) ou de cromossomas completos incapazes de migrar para os polos durante a anáfase da divisão celular. O ensaio *in vitro* de micronúcleos é, portanto, um método *in vitro* que proporciona uma base alargada para a investigação *in vitro* de potenciais de indução de danos cromossómicos, pois permite detetar aneugénios e clastogénios (2) (3) em células que se tenham dividido durante ou após a exposição ao produto químico em estudo (mais pormenores no ponto 13). Os micronúcleos representam danos transmitidos às células-filhas, ao passo que as aberrações cromossómicas contadas nas células em metáfase podem não ser transmitidas. Em ambos os casos, as alterações podem não ser compatíveis com a sobrevivência das células.

Este método de ensaio admite a utilização de protocolos que recorrem ou não ao inibidor de polimerização da actina «citocalasina B» (ou «citoB»). A adição de citocalasina B antes da mitose leva à formação de células binucleadas e, portanto, permite identificar e analisar micronúcleos unicamente nas células que sofreram uma mitose (4) (5). Este método de ensaio também admite a utilização de protocolos sem bloqueio da citocinese, desde que a população celular analisada tenha comprovadamente sofrido mitose.

Além da utilização do ensaio *in vitro* de micronúcleos para identificar produtos químicos indutores da formação de micronúcleos, o recurso à marcação imunoquímica dos cinetócoros ou à hibridação com sondas centroméricas/teloméricas (hibridação fluorescente *in situ* ou «FISH») pode também fornecer informações adicionais sobre os mecanismos de indução de danos cromossómicos e de formação de micronúcleos (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Pode recorrer-se às referidas marcação ou hibridação sempre que se verifique um aumento da formação de micronúcleos e o investigador pretenda determinar se este se deve a clastogénese, a aneugénese ou a ambas.

Uma vez que é possível determinar, com relativa objetividade, os micronúcleos das células em interfase, o pessoal do laboratório apenas precisa de determinar o número de células binucleadas, quando se utiliza citocalasina B, e a incidência de células micronucleadas, em todos os casos. Por conseguinte, as contagens nas lâminas podem ser feitas com relativa rapidez e as análises podem ser automatizadas. É assim possível efetuar contagens a milhares — e já não centenas — de células por tratamento, aumentando as potencialidades do ensaio. Por outro lado, uma vez que podem formar-se micronúcleos devido a cromossomas retardatários («lagging»), é possível detetar agentes indutores de aneuploidia, que são difíceis de estudar em ensaios convencionais de aberrações cromossómicas (por exemplo segundo o capítulo B.10 deste anexo) (18). Todavia, sem recurso a técnicas especiais, como o método FISH referido no ponto 4, o ensaio *in vitro* de micronúcleos descrito neste método de ensaio não permite distinguir os produtos químicos indutores de alterações do número de cromossomas e/ou de alterações da ploidia dos indutores de clastogenicidade.

O ensaio *in vitro* de micronúcleos funciona bem e pode ser realizado numa grande variedade de tipos de células, na presença ou na ausência de citocalasina B. Há numerosos dados que confirmam a validade deste ensaio com vários tipos de células (culturas de linhagens celulares ou culturas primárias) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). É o caso, nomeadamente, dos estudos internacionais de validação coordenados pela *Société Française de Toxicologie Génétique* (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) e dos relatórios do *International Workshop on Genotoxicity Testing* (5) (17). Os dados disponíveis foram também reavaliados num estudo de validação retrospectivo de suficiência de prova efetuado pelo Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) da Comissão Europeia, tendo o ESAC (Comité Científico Consultivo do ECVAM) (37) (38) (39) considerado o método de ensaio cientificamente válido.

O ensaio *in vitro* de micronúcleos em células de mamíferos pode utilizar culturas de linhagens celulares ou culturas primárias de células humanas ou de roedores. Uma vez que a frequência de fundo de micronúcleos influencia a sensibilidade do ensaio, recomenda-se a utilização de tipos de células cuja frequência de fundo de formação de micronúcleos seja definida e estável. As células utilizadas devem ser selecionadas com base na sua capacidade de crescimento em cultura, na estabilidade do cariótipo (incluindo o número de cromossomas) e na frequência da formação espontânea de micronúcleos (40). Os dados atualmente disponíveis não permitem efetuar recomendações sólidas, mas sugerem que, ao avaliar os perigos químicos, é importante considerar o estado *p53*, a estabilidade genética (do cariótipo), a capacidade de reparação do ADN e a origem (roedores ou humanos) das células escolhidas para a realização do ensaio. Dada a evolução constante dos conhecimentos nesta área, os utilizadores do presente método de ensaio são, assim, incentivados a ponderar a influência destas e de outras características celulares no desempenho da linhagem celular na deteção de indução da formação de micronúcleos.

Estabelecem-se definições no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

Os ensaios *in vitro* necessitam, normalmente, de uma fonte exógena de ativação metabólica, a menos que as células sejam metabolicamente competentes em relação aos produtos químicos em estudo. O sistema exógeno de ativação metabólica não reproduz inteiramente as condições *in vivo*. Deve ter-se o cuidado de evitar condições suscetíveis de gerar falsos resultados positivos que não espelhem a genotoxicidade do produto químico em estudo, condições essas que incluem alterações do pH (41) (42) (43) ou da pressão osmótica, interações com o meio de cultura das células (44) (45) ou níveis excessivos de citotoxicidade (ver o ponto 29).

Para analisar a indução de micronúcleos, é essencial que tanto as culturas tratadas como as não-tratadas tenham sofrido mitose. A etapa mais informativa para a contagem de micronúcleos corresponde às células que tenham sofrido uma mitose durante ou após o tratamento com o produto químico em estudo. No caso dos nanomateriais fabricados, são necessárias adaptações específicas do método de ensaio, que não são descritas no presente método.

Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados relacionados com exigências normativas, importa ponderar se — e, em caso afirmativo, por que motivo — o método pode fornecer resultados adequados para o efeito. Essa ponderação não é necessária se exigências normativas impuserem o ensaio da mistura em causa.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

Expõem-se culturas de células humanas ou de outros mamíferos ao produto químico em estudo, quer em presença de uma fonte exógena de ativação metabólica quer sem essa fonte, a menos que se utilizem células com capacidade metabólica adequada (ver ponto 19).

Durante ou após a exposição ao produto químico em estudo, cultivam-se as células por um período suficiente para que ocorram danos nos cromossomas ou outros efeitos no ciclo/divisão celular conducentes à formação de micronúcleos nas células em interfase. Para indução de aneuploidia, o produto químico em estudo deve normalmente estar presente durante a mitose. Colhem-se células em interfase, coloram-se e analisam-se, para pesquisar a presença de micronúcleos. Idealmente, só devem contar-se micronúcleos em células que tenham sofrido mitose completa durante a exposição ao produto químico em estudo ou durante o período pós-tratamento, caso exista. Nas culturas que tenham sido tratadas com um bloqueador da citocinese, basta, para isso, contar apenas as células binucleadas. Na ausência de bloqueador da citocinese, é importante demonstrar (com base no aumento da população celular) a probabilidade elevada de que as células analisadas se tenham dividido durante ou após a exposição ao produto químico em estudo. Em todos os protocolos, é importante demonstrar a ocorrência de proliferação celular, tanto nas culturas tratadas como nas culturas de controlo, determinando-se o grau de citotoxicidade ou de citostase induzido pelo produto químico em estudo em todas as culturas nas quais se procede à contagem de micronúcleos.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Células

Podem utilizar-se linfócitos primários cultivados de sangue periférico humano (ou de outros mamíferos) (7) (20) (46) (47) e uma série de linhagens celulares de roedores, como CHO, V79, CHL/IU e L5178Y, ou de linhagens celulares humanas, como a TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (ver o ponto 6). Já se utilizaram outras linhagens celulares em ensaios de micronúcleos, como HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), células HepG2 (52) (53), A549 e células embrionárias primárias de hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) (54), as quais não foram, porém, ainda completamente validadas. A eventual utilização desses tipos de células ou linhagens celulares terá de ser justificada, com base no seu desempenho comprovado no ensaio, em conformidade com a secção «Critérios de aceitabilidade». Comprovou-se que a citocalasina B pode influenciar o crescimento das células L5178Y, pelo que não se recomenda a sua utilização com esta linhagem celular (23). Se se utilizarem células primárias, deve ponderar-se, sempre que possível e por razões de bem-estar animal, a utilização de células de origem humana, obtidas em conformidade com os princípios éticos e a regulamentação nesse domínio.

Os linfócitos de sangue humano periférico devem provir de indivíduos jovens (18-35 anos), não-fumadores, que não sofram de nenhuma doença nem tenham estado expostos recentemente a níveis de agentes genotóxicos (por exemplo produtos químicos ou radiações ionizantes) suscetíveis de aumentar a incidência de base de células micronucleadas. Desta forma, assegura-se uma incidência de base de células micronucleadas baixa e regular. A incidência de base de células micronucleadas aumenta com a idade, uma tendência mais pronunciada no sexo feminino do que no sexo masculino (55). Se se reunirem para utilização células de mais do que um dador, deve indicar-se o número de dadores. É necessário demonstrar que as células se dividiram, desde o início do tratamento com o produto químico em estudo, até à colheita das células. Uma vez que a sensibilidade dos estádios celulares ao produto químico em estudo pode não ser conhecida, mantêm-se as culturas celulares numa fase de crescimento exponencial (linhagens celulares) ou estimula-se a divisão das células (culturas primárias de linfócitos), de forma que a exposição ocorra em diversos estádios do ciclo celular. Geralmente, as células primárias que necessitam de ser estimuladas com agentes mitogénicos para se dividirem já não estão sincronizadas durante o período de exposição ao produto químico em estudo (caso, por exemplo, dos linfócitos humanos após 48 horas de estimulação mitogénica). Não se recomenda a utilização de células sincronizadas durante o tratamento com o produto químico em estudo, embora essa utilização possa ser aceitável, caso se justifique.

Meios e condições de cultura

Devem manter-se as culturas em meios de cultura e condições de incubação adequados (tipo de recipiente, atmosfera humidificada com concentração de CO₂ de 5 %, se necessário, temperatura de 37 °C). As linhagens celulares devem ser periodicamente verificadas quanto à estabilidade do número modal de cromossomas e à ausência de contaminação por micoplasmas, não devendo as células ser utilizadas caso se verifique que estão contaminadas ou que o número modal de cromossomas se alterou. A duração normal do ciclo celular das linhagens celulares ou das culturas primárias utilizadas no laboratório de ensaio deve ser conhecida e ser compatível com as características celulares publicadas.

Preparação das culturas

Linhagens celulares: repicam-se células de culturas de reserva, inoculam-se num meio de cultura, com densidade tal que as células em suspensão ou em monocamadas continuem a crescer exponencialmente até ao momento da colheita (por exemplo, deve evitar-se a confluência no caso do crescimento de células em monocamadas).

Linfócitos: cultiva-se (por exemplo durante 48 horas, no caso dos linfócitos humanos) sangue integral, tratado com um anticoagulante (por exemplo heparina), ou linfócitos separados, na presença de um agente mitogénico (por exemplo fito-hemaglutinina — PHA —, no caso dos linfócitos humanos) destinado a induzir a divisão celular antes da exposição ao produto químico em estudo e à citocalasina B.

Ativação metabólica

Se se utilizarem células com capacidade metabólica endógena inadequada, será necessário utilizar sistemas metabolizantes exógenos. O sistema mais geralmente utilizado e normalmente recomendado, a menos que se justifique utilizar outro, é uma fração pós-mitocondrial reforçada com cofator (S9), preparada a partir de fígados de roedores (em geral, ratos) tratados com agentes de indução enzimática como Aroclor 1254 (56) (57) ou uma mistura de fenobarbital e b-naftoflavona (58) (59) (60). Esta última combinação não é contrária à Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (61) e comprovou-se ser tão eficaz na indução de oxidases de função mista como o Aroclor 1254 (58) (59) (60). A fração S9 é habitualmente utilizada em concentrações na gama de 1 % a 2 % (v/v), mas pode ser aumentada para 10 % (v/v) no meio de ensaio final. Durante o tratamento, deve evitar-se a utilização de produtos que reduzam o índice mitótico, em especial complexantes de cálcio (62). A classe de produtos químicos em estudo pode influenciar a escolha do tipo e da concentração do sistema exógeno de ativação metabólica ou do indutor metabólico utilizado.

Preparação do produto químico em estudo

Os produtos químicos sólidos devem ser adicionados a solventes adequados e, se necessário, ser diluídos antes do tratamento das células. Os produtos químicos líquidos podem ser adicionados diretamente ao sistema de ensaio e/ou ser diluídos antes de serem utilizados no tratamento do sistema de ensaio. Para o ensaio de produtos químicos gasosos ou voláteis, devem ser efetuadas alterações adequadas aos protocolos normalizados, como o tratamento em recipientes de cultura hermeticamente fechados (63) (64) (65). A preparação do produto químico em estudo deve ocorrer imediatamente antes do tratamento, a menos que dados de estabilidade demonstrem que o produto pode ser armazenado.

Condições de realização do ensaio

Solventes

O solvente deve ser escolhido de modo a otimizar a solubilidade dos produtos químicos em estudo sem afetar negativamente a realização do ensaio (por exemplo por alteração do crescimento celular, afetação da integridade do produto químico em estudo, reação com os recipientes de cultura ou comprometimento do sistema de ativação metabólica). Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente (ou meio de cultura) aquoso. A água e o sulfóxido dimetílico (DMSO), por exemplo, são solventes consagrados. Em geral, os solventes orgânicos não devem exceder 1 % (v/v). Caso se dissolva a citocalasina B em DMSO, a quantidade total de solvente orgânico utilizada para o produto químico em estudo e para a citocalasina B não deve exceder 1 % (v/v); caso contrário, será necessário recorrer a amostras de controlo do solvente para verificar se, na percentagem utilizada, o solvente orgânico tem efeitos adversos. Os solventes aquosos (soluções salinas ou água) não devem exceder 10 % (v/v) no meio de tratamento final. Se se utilizarem solventes cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas (por exemplo: etanol ou acetona), devem ser fornecidos dados que comprovem que esses solventes são compatíveis com o produto químico em estudo e com o sistema de ensaio e não são genotóxicos à concentração utilizada. Na ausência de dados comprovativos, é importante incluir amostras de controlo não-tratadas (ver o apêndice 1), bem como amostras de controlo do solvente, para demonstrar que o solvente escolhido não induz efeitos deletérios ou cromossómicos (por exemplo: aneuploidia ou clastogenicidade).

Utilização de citocalasina B como bloqueador da citocinese

Um dos aspetos mais importantes a ponderar no desempenho do ensaio *in vitro* de micronúcleos é o imperativo de garantir que as células sujeitas à contagem sofreram mitose completa durante o tratamento ou durante o eventual período de incubação pós-tratamento. Deve, portanto, circunscrever-se a contagem de micronúcleos às células que sofreram mitose durante ou após o tratamento. A citocalasina B tem sido o agente mais utilizado para bloquear a citocinese, pois inibe a agregação da actina e impede assim a separação das células-filhas após a mitose, conduzindo à formação de células binucleadas (6) (66) (67). Caso se utilize citocalasina B, pode medir-se simultaneamente o efeito do produto químico em estudo na cinética da proliferação celular. Quando se utilizam linfócitos humanos, é necessário recorrer a citocalasina B como bloqueador da citocinese, porque, caso contrário, a duração do ciclo celular variaria de dador para dador e nem todos os linfócitos responderiam à PHA. Não é obrigatório utilizar citocalasina B no caso de outros tipos de células, caso possa comprovar-se que as células utilizadas se dividiram conforme se explica no ponto 27. Normalmente, tampouco se utiliza citocalasina B quando se recorre a métodos de citometria de fluxo para avaliar a formação de micronúcleos nas amostras.

O laboratório determina, para cada tipo de célula, a concentração de citocalasina B necessária para otimizar a frequência de células binucleadas nas culturas de controlo do solvente, concentração essa que, comprovadamente, deve gerar um número de células binucleadas suficiente para a contagem. A concentração adequada de citocalasina B situa-se normalmente entre 3 e 6 µg/ml (19).

Medição da proliferação celular e da citotoxicidade e escolha das concentrações de tratamento

Quando se determina a concentração máxima a ensaiar do produto químico em estudo, devem ser evitadas concentrações suscetíveis de gerar respostas positivas falsas, como as que produzam citotoxicidade excessiva (ver o ponto 29), precipitações no meio de cultura (ver o ponto 30) ou alterações pronunciadas do pH ou da pressão osmótica (ver o ponto 9). Se, ao ser adicionado, o produto químico em estudo causar uma alteração pronunciada do pH do meio, o pH pode ser ajustado por tamponamento do meio de tratamento final, de modo a evitar falsos resultados positivos e manter condições de cultura adequadas.

Efetuem-se medições da proliferação celular para garantir um número suficiente de células tratadas que sofreram mitose durante o ensaio e que os tratamentos são efetuados a níveis adequados de citotoxicidade (ver o ponto 29). A citotoxicidade deve ser determinada na experiência principal com e sem ativação metabólica, utilizando um indicador apropriado de crescimento e morte celular (ver os pontos 26 e 27). Embora a avaliação da citotoxicidade num ensaio preliminar possa ser útil para definir melhor as concentrações a utilizar no ensaio principal, esse ensaio preliminar não é obrigatório. Se for efetuado, não deve substituir a determinação da citotoxicidade no ensaio principal.

O tratamento das culturas com citocalasina B e a determinação das frequências relativas de células mononucleadas, binucleadas e plurinucleadas na cultura celular constituem um método rigoroso de quantificação do efeito do tratamento na proliferação celular e da atividade citotóxica e citostática do mesmo (6), garantindo que apenas são contadas ao microscópio células que se dividiram durante ou após o tratamento. Recomenda-se a medição do índice de proliferação com citocinese bloqueada (CBPI) (6) (27) (68) ou do índice de replicação (IR) de, pelo menos, 500 células por cultura (ver as fórmulas respetivas no apêndice 2), para estimar a atividade citotóxica e citostática do tratamento por comparação dos valores obtidos para as culturas tratadas e para as culturas de controlo. A avaliação de outros indicadores de citotoxicidade (por exemplo: integridade celular, apoptose, necrose, contagem das células em metáfase, ciclo celular) pode fornecer informações úteis, mas não pode substituir-se à do CBPI nem à do IR.

Nos estudos em que não se recorra à citocalasina B, é necessário demonstrar que as células da cultura se dividiram, de modo que a divisão de uma parte substancial das células contadas tenha ocorrido durante ou após o tratamento com o produto químico em estudo; caso contrário, podem surgir respostas negativas falsas. Recomenda-se a medição da duplicação da população em termos relativos (RPD) ou do aumento relativo da contagem celular (RICC) para estimar a atividade citotóxica e citostática do tratamento (17) (68) (69) (70) (71) (ver as fórmulas no apêndice 2). Quando os tempos de amostragem forem dilatados — por exemplo: duração do tratamento equivalente a 1,5 a 2 vezes a duração normal do ciclo celular e colheita uma vez transcorrido um período adicional igualmente equivalente a 1,5 a 2 vezes a duração normal do ciclo celular, daí resultando, no total, tempos de amostragem superiores a 3 a 4 vezes a duração normal do ciclo celular (ver os pontos 38 e 39) —, a duplicação da população em termos relativos pode subestimar a citotoxicidade (71). Nestas condições, o RICC poderá constituir uma melhor estimativa, mas a avaliação da citotoxicidade após um período equivalente a 1,5 a 2 vezes a duração normal do ciclo celular não deixará de proporcionar uma estimativa útil. A avaliação de outros marcadores de citotoxicidade ou de citóstase (por exemplo: integridade celular, apoptose, necrose, contagem das células em metáfase, índice de proliferação, ciclo celular, pontes nucleoplásmicas ou protrusões nucleares) pode fornecer informações úteis adicionais, mas não pode substituir-se à da RPD nem à do RICC.

Devem ser avaliadas, pelo menos, três concentrações de ensaio (não incluindo as amostras de controlo positivo nem as amostras de controlo do solvente) que cumpram os critérios de aceitabilidade (citotoxicidade adequada, número de células etc.). Independentemente do tipo de células (linhagens celulares ou culturas primárias de linfócitos), podem ser utilizados, para cada concentração ensaiada, replicados da cultura tratada ou uma única cultura tratada. Embora seja aconselhável a utilização de culturas em duplicado, uma cultura única é igualmente aceitável, desde que se conte o mesmo número total de células na cultura única e nas culturas em duplicado. O recurso a uma única cultura é particularmente importante quando se avaliam mais de três concentrações (ver os pontos 44 e 45). Os resultados obtidos a uma dada concentração com as culturas replicadas independentes podem ser agrupados para a análise de dados. No caso dos produtos químicos que demonstrem pouca ou nenhuma citotoxicidade, são normalmente adequadas concentrações espaçadas por um fator de 2 a 3. Quando se observa citotoxicidade, as concentrações escolhidas para o ensaio devem definir uma gama com início na concentração citotóxica descrita no ponto 29 e que inclua concentrações às quais se observe toxicidade moderada e pouca ou nenhuma citotoxicidade. Muitos produtos químicos estudados apresentam curvas concentração-resposta com declive acentuado, pelo que, para obter dados a citotoxicidade baixa e moderada ou para analisar em pormenor a relação dose/resposta, será necessário recorrer a concentrações menos espaçadas e/ou a mais de três concentrações (da cultura única ou dos replicados), em especial nas situações em que for necessário repetir o ensaio (ver o ponto 60).

Se a concentração máxima se basear na citotoxicidade, a concentração mais elevada deve visar $55 \% \pm 5 \%$ de citotoxicidade, utilizando os parâmetros de citotoxicidade recomendados (ou seja, redução do RICC e da RPD, no caso das linhagens celulares sem utilização de citocalasina B, e redução do CBPI ou do IR, quando se utilizar citocalasina B, para $45 \% \pm 5 \%$ da amostra de controlo negativa ensaiada em paralelo) (72). Os resultados positivos observados apenas no extremo superior da gama de $55 \% \pm 5 \%$ de citotoxicidade devem ser interpretados com precaução (71).

No caso de produtos químicos pouco solúveis não-citotóxicos a concentrações inferiores à concentração insolúvel mínima, a maior concentração analisada deve gerar, no final do tratamento com o produto químico em estudo, turbidez ou um precipitado visível a olho nu ou com auxílio de um microscópio invertido. Mesmo no caso de se observar citotoxicidade acima da menor concentração insolúvel, é conveniente ensaiar uma única concentração que gere turbidez ou um precipitado visível, porque o precipitado pode induzir efeitos falsos. A concentração que gera um precipitado, devem ser tomados os devidos cuidados para assegurar que este não interfere na realização do ensaio (por exemplo em termos de coloração ou de contagem). Neste contexto, pode ser útil determinar a solubilidade no meio de cultura antes do ensaio.

Se não se observar precipitação nem citotoxicidade condicionante, a maior concentração ensaiada deve corresponder à menor das seguintes concentrações: 10 mM, 2 mg/ml ou 2 µl/ml (73) (74) (75). Se o produto químico em estudo não for de composição definida — caso, por exemplo, das substâncias de composição desconhecida ou variável, de produtos de reação complexos ou de matérias biológicas, os ditos «UVCB» (76), de extratos ambientais etc. —, a concentração máxima, na ausência de citotoxicidade suficiente, pode ter de ser mais elevada (por exemplo 5 mg/ml), para aumentar a concentração de cada componente. Importa, contudo, notar que estes requisitos podem diferir no caso de medicamentos para uso humano (93).

Amostras de controlo

Para cada colheita, devem ser ensaiadas amostras de controlo negativas em paralelo (ver o ponto 21), procedendo-se do mesmo modo que no caso da exposição ao produto químico em estudo, mas expondo as células em cultura apenas ao solvente e ao meio.

São necessárias amostras de controlo positivo correspondentes para demonstrar a capacidade do laboratório de identificar clastogénios e aneugénios nas condições do protocolo de ensaio, bem como a eficácia do sistema exógeno de ativação metabólica (se for caso disso). O quadro 1 apresenta exemplos de produtos químicos de controlo positivo. Se tal se justificar, podem ser utilizados outros produtos químicos de controlo positivo.

Presentemente, não se conhecem aneugénios que necessitem de ativação metabólica para manifestarem atividade genotóxica (17). Dado que os ensaios de toxicidade genética *in vitro* em células de mamíferos estão suficientemente normalizados no que respeita a tratamentos paralelos de curta duração com e sem ativação metabólica por período idêntico, o recurso a produtos químicos de controlo positivo pode limitar-se a um clastogénio que necessite de ativação metabólica. Neste caso, uma resposta clastogénica a um único produto químico de controlo positivo será reveladora da atividade do sistema de ativação metabólica e da reatividade do sistema de ensaio. No entanto, deve utilizar-se um produto químico de controlo positivo no caso dos tratamentos prolongados (sem S9), dado que a duração do tratamento diferirá da do ensaio com ativação metabólica. Se, para um tratamento de curta duração com e sem ativação metabólica, se utilizar um clastogénio como produto químico de controlo positivo único, deve utilizar-se um aneugénio para um tratamento prolongado sem ativação metabólica. No caso das células metabolicamente competentes que não necessitam de S9, deve utilizar-se um produto químico de controlo positivo para a clastogenicidade e outro para a aneugenicidade.

Cada produto químico de controlo positivo deve ser utilizado a uma ou mais concentrações às quais se preveja um aumento detetável e reprodutível relativamente à linha de fundo para demonstrar a sensibilidade do sistema de ensaio (evidenciando efeitos claros, mas não imediatamente reveladores da identidade das lâminas codificadas à pessoa que efetua as contagens), não devendo a resposta ser comprometida por manifestações de citotoxicidade superiores aos limites especificados neste método de ensaio.

*Quadro 1***Produtos químicos de referência recomendados para avaliar a competência técnica do laboratório e para selecionar os produtos químicos de controlo positivo**

Categoria	Produto químico	N.º de registo CAS
1. Clastogénios ativos sem ativação metabólica		
	Metanossulfonato de metilo	66-27-3
	Mitomicina C	50-07-7
	N-óxido de 4-nitroquinolina	56-57-5
	Arabinósido de citosina	147-94-4
2. Clastogénios que necessitam de ativação metabólica		
	Benzo[a]pireno	50-32-8
	Ciclofosfamida	50-18-0

Categoria	Produto químico	N.º de registo CAS
3. Aneugénios		
	Colquicina	64-86-8
	Vimblastina	143-67-9

PROTOCOLO DE ENSAIO

Programa de tratamento

A fim de maximizar a probabilidade de deteção de ações aneugénicas ou clastogénicas num determinado estágio do ciclo celular, é importante tratar com o produto químico em estudo um número de células suficientemente representativo de todos os estádios desse ciclo. Os tratamentos devem sempre começar e terminar durante a fase de crescimento exponencial das células, as quais devem continuar a multiplicar-se até à colheita das amostras. O programa de tratamento aplicado às linhagens celulares e às culturas de células primárias pode, portanto, diferir um pouco do aplicado aos linfócitos, que necessitam de estimulação mitogénica para iniciarem o seu ciclo celular (17). Relativamente aos linfócitos, a melhor prática é iniciar o tratamento com o produto químico em estudo 44 a 48 horas após a estimulação com PHA, quando as células estiverem a dividir-se sem sincronia (6).

Os dados publicados (19) indicam que, na sua maioria, os aneugénios e os clastogénios são detetados com um tratamento curto durante 3 a 6 horas, na presença ou ausência de S9, seguido da remoção do produto químico em estudo e da colheita das amostras uma vez transcorrido um período equivalente à duração normal de 1,5 a 2,0 ciclos celulares após o início do tratamento (7).

No entanto, para uma avaliação completa, necessária para concluir por um resultado negativo, devem ser aplicadas, nos tratamentos curtos com e sem ativação metabólica e nos tratamentos longos sem ativação metabólica, as três seguintes condições experimentais (ver os pontos 56, 57 e 58):

- exposição das células ao produto químico em estudo, sem ativação metabólica, durante 3 a 6 horas; colheita das amostras uma vez transcorrido um período equivalente à duração normal de 1,5 a 2,0 ciclos celulares após o início do tratamento (19);
- exposição das células ao produto químico em estudo, com ativação metabólica, durante 3 a 6 horas; colheita das amostras uma vez transcorrido um período equivalente à duração normal de 1,5 a 2,0 ciclos celulares após o início do tratamento (19);
- exposição contínua das células, sem ativação metabólica, até à colheita das amostras uma vez transcorrido um período equivalente à duração normal de 1,5 a 2,0 ciclos celulares.

Se a aplicação de alguma destas condições experimentais conduzir a uma resposta positiva, poderá não ser necessário investigar os outros regimes de tratamento.

Caso esteja comprovado ou se suspeite que o produto químico em estudo afeta a duração do ciclo celular (por exemplo quando se estudam análogos dos nucleósidos), sobretudo no caso de células competentes em p53 (35) (36) (77), os períodos de recuperação e de colheita de amostras podem ser prolongados no equivalente à duração normal de 1,5 a 2,0 ciclos celulares (ou seja, período total equivalente à duração de 3,0 a 4,0 ciclos celulares, após o início do tratamento curto ou longo). Estas possibilidades alternativas destinam-se a superar as situações em que se tema a eventual interação do produto químico em estudo com a citocalasina B. Se o período transcorrido até à colheita das amostras tiver sido dilatado (ou seja, tempo de cultura equivalente à duração de 3,0 a 4,0 ciclos celulares), é necessário garantir que as células ainda estejam em franca divisão. Por exemplo, o crescimento exponencial dos linfócitos pode já estar em declínio 96 horas após a estimulação, e pode haver confluência nas monocamadas celulares em cultura.

Os programas propostos para o tratamento das células resumem-se no quadro 2. Estes programas de tratamento gerais podem ser alterados (justificação necessária) em função da estabilidade ou reatividade do produto químico em estudo ou das especificidades de crescimento das células utilizadas

Quadro 2

Tratamento das células e cronologia da colheita de amostras no ensaio *in vitro* de micronúcleos

Linfócitos, células primárias e linhagens celulares tratados <u>com</u> aplicação de citocalasina B	+ S9 Tratamento curto	Tratamento de três a seis horas, na presença de S9; Remoção da S9 e do meio de tratamento; Adição de meio fresco e de citocalasina B; Colheita após 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais, depois de iniciado o tratamento.
	– S9 Tratamento curto	Tratamento de três a seis horas; Remoção do meio de tratamento; Adição de meio fresco e de citocalasina B; Colheita após 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais, depois de iniciado o tratamento.
	– S9 Tratamento prolongado	Tratamento durante período equivalente a 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais, na presença de citocalasina B; Colheita no termo do período de tratamento.

Linhagens celulares tratadas sem aplicação de citocalasina B
(Procede-se de modo idêntico ao acima descrito, exceto que não se adiciona citocalasina B.)

No caso das culturas em monocamada, no final do tratamento de três a seis horas podem estar presentes células mitóticas (identificáveis pela sua forma arredondada e por se destacarem da superfície). Por se destacarem com facilidade, estas células podem perder-se quando se remove o meio que contém o produto químico em estudo. Caso se verifique um aumento substancial do número de células mitóticas relativamente às amostras de controlo, indicativo de provável suspensão da mitose, as células devem ser recolhidas por centrifugação e reinseridas na cultura, para que, no momento da colheita, não se percam células que estejam em mitose e, conseqüentemente, em risco de formação de micronúcleos ou de ocorrência de aberrações cromossómicas.

Colheita de células e preparação das lâminas

As células de cada cultura devem ser colhidas e manipuladas separadamente. A preparação das células pode incluir um tratamento hipotónico, mas esse passo não será necessário se se puder obter uma dilatação adequada das células por outra via. Podem ser utilizadas várias técnicas na preparação das lâminas, desde que se obtenham preparações celulares de alta qualidade para a contagem. As células com citoplasma e membrana celular intactos destinam-se à pesquisa de micronúcleos e (no método com bloqueio da citocinese) a uma identificação fiável das células binucleadas.

A coloração das lâminas pode fazer-se por vários métodos: por exemplo com o corante Giemsa ou corantes fluorescentes específicos do ADN. A utilização de corantes fluorescentes adequados — por exemplo: laranja de acridina (78) ou uma combinação do corante 33258 da Hoechst e de pironina-Y (79) — pode eliminar alguns erros associados à utilização de corantes inespecíficos do ADN. Na identificação do conteúdo dos micronúcleos (se houver interesse em obter informações sobre os mecanismos de formação destes), podem ser utilizados anticorpos anticinetócoro, o método FISH com sondas de ADN pancentromérico ou a marcação *in situ* com iniciadores pancentroméricos específicos, em combinação com uma coloração de contraste adequada do ADN (os cromossomas completos adquirem coloração, os fragmentos de cromossomas acêntricos não) (16) (17). Na diferenciação entre clastogénios e aneugénios, podem ser utilizados outros métodos, cuja eficácia tenha sido demonstrada e validada. Por exemplo, no caso de determinadas linhagens celulares, a medição dos núcleos sub-2N como hipodiploidia, por meio de técnicas como a análise de imagem, a citometria de varrimento por laser ou a citometria de fluxo, também pode fornecer informações úteis (80) (81) (82). O exame da morfologia dos núcleos pode dar indicações sobre eventual aneuploidia. Um ensaio de aberrações cromossómicas a células em metáfase, de preferência no mesmo tipo de células e segundo protocolo de sensibilidade comparável, pode também ser útil para determinar se os micronúcleos se devem a cisão de cromossomas (sabendo que as perdas cromossómicas não são detetáveis nesse ensaio).

Análise

Antes da análise microscópica da frequência de micronúcleos, codificam-se todas as lâminas independentemente umas das outras, incluindo as correspondentes às amostras de controlo do solvente, às amostras de controlo não-tratadas (se forem utilizadas) e às amostras de controlo positivo. Quando se utilizam sistemas de contagem automáticos (por exemplo: citometria de fluxo, citometria de varrimento por laser ou análise de imagem), devem ser utilizadas técnicas adequadas para evitar eventuais erros sistemáticos ou enviesamentos. Independentemente dos meios automáticos utilizados na contagem dos micronúcleos, devem ser concomitantemente determinados o CBPI, o IR, a RPD e o RICC.

Nas culturas de células tratadas com citocalasina B, analisa-se a frequência de micronúcleos em, pelo menos, 2 000 células binucleadas por nível de concentração e por amostra de controlo (83), igualmente repartidas pelos replicados eventualmente utilizados. Caso haja apenas uma cultura por dose (ver o ponto 28), deve efetuar-se a contagem em, pelo menos, 2 000 células binucleadas dessa cultura (83). Se o número de células disponível para contagem, em cada nível de concentração, for substancialmente inferior a 1 000 células binucleadas por cultura (culturas em duplicado) ou substancialmente inferior a 2 000 células binucleadas (cultura única) e não se detetar um aumento significativo de micronúcleos, deve repetir-se o ensaio, utilizando mais células ou concentrações menos citotóxicas, conforme seja mais conveniente. Devem ser tomadas precauções para não se contarem células binucleadas com formas irregulares ou cujos núcleos tenham dimensões muito diferentes. Também não devem confundir-se células binucleadas e células plurinucleadas com dilatação insuficiente. Não devem pesquisar-se micronúcleos em células com mais de dois núcleos principais, cuja frequência normal de micronúcleos pode ser mais elevada (84). Admite-se a contagem das células mononucleadas se o produto químico em estudo interferir comprovadamente com a atividade da citocalasina B. Nesses casos, pode ser útil repetir o ensaio sem citocalasina B. A contagem das células mononucleadas, adicionalmente à contagem das células binucleadas, pode fornecer informações úteis, mas não é obrigatória (85) (86).

Nas linhagens celulares ensaiadas sem tratamento com citocalasina B, deve efetuar-se a contagem de micronúcleos em, pelo menos, 2 000 células por nível de concentração e por amostra de controlo (83), igualmente repartidas pelos replicados eventualmente utilizados. Quando se utiliza apenas uma cultura por nível de concentração (ver o ponto 28), deve efetuar-se a contagem em, pelo menos, 2 000 células dessa cultura. Se o número de células disponível para contagem, em cada nível de concentração, for substancialmente inferior a 1 000 células por cultura (culturas em duplicado) ou substancialmente inferior a 2 000 células (cultura única) e não se detetar um aumento significativo de micronúcleos, deve repetir-se o ensaio, utilizando mais células ou concentrações menos citotóxicas, conforme seja mais conveniente.

Quando se utiliza citocalasina B, devem ser utilizadas, pelo menos, 500 células por cultura para calcular o CBPI ou o índice de replicação, a fim de determinar a proliferação celular (ver o apêndice 2). Se os tratamentos forem efetuados sem citocalasina B, é essencial demonstrar que as células em cultura se dividiram como se referiu nos pontos 24 a 28.

Competência técnica do laboratório

A fim de comprovar que possui experiência suficiente na realização do ensaio antes de passar a utilizar este método em ensaios de rotina, o laboratório deve ter efetuado uma série de experiências com produtos químicos de referência positivos que ajam por diferentes mecanismos (pelo menos um com e outro sem ativação metabólica e um que aja por mecanismo aneugénico, sendo os produtos químicos correspondentes selecionados da lista constante do quadro 1), bem como várias amostras de controlo negativas (utilizando culturas não-tratadas e vários solventes/excipientes). As respostas observadas às amostras de controlo positivas e negativas devem ser coerentes com as referências bibliográficas. Este requisito não é aplicável a laboratórios com experiência, isto é, que disponham de uma base de dados históricos como se refere nos pontos 49 a 52.

O laboratório deve investigar uma seleção de produtos químicos de controlo positivo (ver o quadro 1), aplicados em tratamentos de curta e de longa duração sem ativação metabólica, bem como em tratamentos curtos com ativação metabólica, a fim de demonstrar a sua competência na deteção de produtos químicos clastogénicos e aneugénicos, determinar a eficácia do sistema de ativação metabólica e demonstrar a adequação dos métodos de contagem (análise visual ao microscópio, citometria de fluxo, citometria de varrimento por laser ou análise de imagem). A gama de concentrações dos produtos químicos selecionados deve ser escolhida de forma a proporcionar aumentos reprodutíveis e dependentes da concentração, relativamente ao nível de fundo, que permitam demonstrar a sensibilidade e a gama dinâmica do sistema de ensaio.

Dados históricos de controlo

O laboratório deve elaborar:

- um historial da gama e da distribuição dos controlos positivos;
- um historial da gama e da distribuição dos controlos negativos (amostras não-tratadas, solvente).

Ao obter os primeiros dados para um historial de distribuição dos controlos negativos, os controlos negativos realizados em paralelo devem ser coerentes com os dados de controlo negativo publicados, caso existam. À medida que se adicionarem mais dados experimentais à distribuição dos controlos, os controlos negativos realizados em paralelo devem, idealmente, situar-se dentro dos limites de 95 % dos controlos daquela distribuição (87) (88). A base de dados históricos de controlo negativo do laboratório deve ser inicialmente constituída por um mínimo de 10 experiências, embora, de preferência, deva ser constituída por, pelo menos, 20 experiências efetuadas em condições experimentais comparáveis. Os laboratórios devem utilizar métodos de controlo de qualidade, como gráficos de controlo (por exemplo: gráficos C ou gráficos de barras (88)), para identificar a variabilidade dos seus dados de controlo positivo e de controlo negativo e demonstrar que o laboratório domina a metodologia (83). Encontram-se na bibliografia (87) outras recomendações sobre o modo de obter e utilizar dados históricos (critérios de inclusão e exclusão de dados em séries históricas e critérios de aceitação das experiências realizadas).

As eventuais alterações ao protocolo experimental devem ser ponderadas em função da coerência dos dados com as bases de dados históricos de controlo do laboratório. As incoerências importantes que venham a verificar-se devem traduzir-se na constituição de uma nova base de dados históricos de controlo.

Os dados de controlo negativo devem ser constituídos pela incidência de células micronucleadas numa única cultura ou pela soma das incidências correspondentes a cada replicado em cultura, como descrito no ponto 28. Os controlos negativos realizados em paralelo devem, idealmente, situar-se dentro dos limites de 95 % dos controlos da distribuição da base de dados históricos de controlo negativo do laboratório (87) (88). Caso se situem fora desses limites, os dados de controlos negativos realizados em paralelo podem ser aceitáveis para inclusão no historial de distribuição de controlos se não forem valores aberrantes extremos, se o sistema de ensaio estiver comprovadamente dominado (ver o ponto 50) e se não houver indícios de erro humano ou de deficiência técnica.

DADOS E RELATÓRIOS

Apresentação dos resultados

Se se utilizar a técnica do bloqueio da citocinese, a avaliação da indução de micronúcleos deve basear-se apenas na frequência de células binucleadas que possuam micronúcleos, independentemente do número de micronúcleos por célula. A contagem do número de células com um, dois ou mais micronúcleos pode ser indicada separadamente no relatório e fornecer informações úteis, mas não é obrigatória.

Devem ser efetuadas medições em paralelo de citotoxicidade e/ou citóstase em todas as culturas tratadas e nas culturas de controlo positivo e de controlo negativo (16). Para medir o atraso do ciclo celular quando se recorre ao método do bloqueio da citocinese, calcula-se o CBPI e o índice de replicação de todas as culturas tratadas e de controlo. Se não se adicionar citocalasina B, determina-se a RPD ou o RICC — ver o apêndice 2.

Os dados devem ser fornecidos por cultura e resumidos em quadros.

Critérios de aceitabilidade

A aceitação do ensaio baseia-se nos seguintes critérios:

- Um controlo negativo realizado em paralelo é considerado aceitável para inclusão na base de dados históricos de controlo negativo do laboratório nos termos descritos no ponto 50.
- Os controlos positivos realizados em paralelo (ver o ponto 50) devem induzir respostas compatíveis com as incluídas na base de dados históricos de controlo positivo do laboratório e gerar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo realizado em paralelo.
- Devem respeitar-se os critérios de proliferação celular relativos ao controlo do solvente (pontos 25 a 27).
- Foram ensaiadas todas as condições experimentais, salvo se uma delas tiver dado resultados positivos (ver os pontos 36 a 40).
- É analisável um número adequado de células e de concentrações (pontos 28 e 44 a 46).
- Os critérios de seleção da concentração máxima são coerentes com os descritos nos pontos 24 a 31.

Avaliação e interpretação dos resultados

Se se cumprirem todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo se, nas condições experimentais examinadas (ver os pontos 36 a 39):

- pelo menos uma das concentrações ensaiadas apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo realizado em paralelo (89);
- esse aumento, avaliado por recurso a uma análise de tendências adequada, for dependente da dose em, pelo menos, uma das condições experimentais (ver o ponto 28);
- nenhum dos resultados estiver fora da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (por exemplo: limites de 95 % dos controlos, com base numa distribuição de Poisson; ver o ponto 52).

Se todos estes critérios estiverem preenchidos, o produto químico em estudo é considerado passível de induzir cisões e/ou aquisições ou perdas cromossómicas neste sistema de ensaio. As referências bibliográficas (90), (91) e (92) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados.

Se se cumprirem todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo se, nas condições experimentais examinadas (ver os pontos 36 a 39):

- nenhuma das concentrações ensaiadas apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo realizado em paralelo;
- não se observar nenhum aumento dependente da dose, numa avaliação feita com base numa análise de tendências adequada;
- todos os resultados se situarem dentro da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (por exemplo: limites de 95 % dos controlos, com base numa distribuição de Poisson; ver o ponto 52).

Nestas circunstâncias, o produto químico em estudo é considerado não passível de induzir cisões e/ou aquisições ou perdas cromossómicas neste sistema de ensaio. As referências bibliográficas (90), (91) e (92) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados.

As respostas inequivocamente positivas ou inequivocamente negativas dispensam confirmação.

No caso de a resposta não ser inequivocamente positiva nem inequivocamente negativa, como se descreveu, e/ou para se tirarem conclusões sobre a importância biológica do resultado, os dados devem ser avaliados por peritos e/ou ser objeto de estudos complementares. Neste contexto, pode ser útil contar células adicionais (se isso se justificar) ou repetir o ensaio, eventualmente com alteração das condições experimentais (por exemplo: espaçamento diferente das concentrações ou outras condições de ativação metabólica, como a concentração ou origem da S9).

Em certos casos, raros, mesmo após estudos complementares, os dados obtidos não permitirão concluir por um resultado positivo ou negativo, pelo que se considerará que o resultado é ambíguo.

A indução de micronúcleos, por produtos químicos com esse efeito, nestes ensaios *in vitro* pode dever-se a cisão ou perda cromossómica ou a ambos os efeitos. Para aprofundar se o mecanismo da indução de micronúcleos se deve a atividade clastogénica e/ou a atividade aneugénica, pode recorrer-se a métodos de análise que utilizam anticorpos anticinetócoro, sondas centroméricas específicas *in situ* ou outros.

Relatório do ensaio

Elementos a constar do relatório do ensaio:

Produto químico em estudo:

- origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecidos;
- estabilidade, se conhecida;
- reatividade com o solvente/excipientes ou com o meio de cultura das células;
- solubilidade e estabilidade no solvente, se conhecidas;
- medição do pH, da pressão osmótica e da quantidade de precipitado no meio de cultura ao qual foi adicionado o produto químico em estudo, consoante o caso.

Substância monocomponente:

- aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas relevantes;
- dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o número CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural, o grau de pureza, a identidade química das impurezas, se justificado e exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

- caracterização, tanto quanto possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Solvente:

- justificação da escolha;
- percentagem no meio de cultura final.

Células:

- tipo e origem das células utilizadas;
- adequação do tipo de célula utilizado;
- ausência de micoplasmas, no caso das linhagens celulares;
- no respeitante às linhagens celulares, dados relativos à duração do ciclo celular e ao índice de proliferação;
- caso se utilizem linfócitos, sexo e idade dos dadores de sangue e quaisquer informações relevantes sobre o dador, utilização de sangue integral ou de linfócitos separados e agente mitogénico utilizado;
- duração normal (correspondente ao controlo negativo) do ciclo celular;
- no respeitante às linhagens celulares, número de repicagens (se conhecido);
- no respeitante às linhagens celulares, métodos de manutenção das culturas;
- no respeitante às linhagens celulares, número modal de cromossomas.

Condições de realização do ensaio:

- identificação da substância bloqueante da citocinese eventualmente utilizada (por exemplo citocalasina B), concentração dessa substância e tempo de exposição das células;
- concentração do produto químico em estudo, expressa em concentração final no meio de cultura (por exemplo: µg/ml ou mg/ml de meio de cultura ou mM no meio de cultura);
- justificação da seleção das concentrações e do número de culturas, incluindo dados de citotoxicidade e limitações de solubilidade;
- composição dos meios e, quando aplicável, concentração de CO₂; teor de humidade;
- concentração (e/ou volume) do solvente e do produto químico em estudo no meio de cultura;
- tempo e temperatura de incubação;
- duração do tratamento;
- tempo decorrido entre o tratamento e a colheita das células;
- densidade celular da sementeira, se for caso disso;
- tipo e composição do sistema de ativação metabólica (fonte de S9, método de preparação da mistura de S9, concentração ou volume da mistura de S9 e de S9 no meio de cultura final, controlos de qualidade da S9 — por exemplo: atividade enzimática, esterilidade, capacidade metabólica);
- produtos químicos de controlo positivo e negativo, concentrações finais, condições e durações de tratamento, períodos de recuperação;
- métodos de preparação das lâminas e técnica de coloração utilizada;
- critérios de contagem das células micronucleadas (seleção das células examináveis e identificação dos micronúcleos);
- células analisadas (número);

- métodos de medição da citotoxicidade;
- outros dados pertinentes relativos à citotoxicidade e ao método utilizado;
- critérios definidos para que os resultados do estudo sejam considerados positivos, negativos ou ambíguos;
- método(s) de análise estatística utilizado(s);
- métodos (como a utilização de anticorpos anticinetócoro ou de sondas pancentroméricas específicas) para determinar se os micronúcleos contêm cromossomas inteiros ou fragmentos de cromossomas, se aplicável;
- métodos utilizados para determinar o pH, a pressão osmótica e a precipitação.

Resultados:

- definição das células aceitáveis para análise;
- se não se utilizar citocalasina B, número de células tratadas e número de células colhidas por cultura, caso se utilizem linhagens celulares;
- métodos de medição da citotoxicidade utilizados (por exemplo: CBPI ou índice de replicação, caso se recorra ao método do bloqueio da citocinese, ou RICC ou RPD, no caso contrário); outros exames eventualmente realizados (por exemplo: grau de confluência celular, apoptose, necrose, contagem das células em metáfase, frequência de células binucleadas);
- sinais de precipitação e instante da determinação;
- dados de pH e de pressão osmótica do meio de tratamento, caso tenham sido determinados;
- distribuição das células mono, bi e plurinucleadas, se se utilizar um método de bloqueio da citocinese;
- número de células com micronúcleos, para cada cultura tratada e de controlo, especificando, caso se justifique, se são células binucleadas ou mononucleadas;
- relação concentração-resposta, quando for possível determiná-la;
- dados (concentrações e solventes) relativos às amostras de controlo negativo (solvente) e de controlo positivo, ensaiadas em paralelo;
- dados históricos relativos às amostras de controlo negativo (solvente) e de controlo positivo, indicando intervalos, médias e desvios-padrão e limites de 95 % dos controlos da distribuição, bem como o número de dados;
- análise estatística; valores p (probabilidade de significância), caso sejam conhecidos;

Discussão dos resultados.

Conclusões.

REFERÊNCIAS

- 1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234. OCDE, Paris.
- 2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, vol. 392/1-2, pp. 1-4.
- 3) Parry, J.M., Sors, A. (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, vol. 287/1, pp. 3-15.
- 4) Fenech, M., Morley, A.A. (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, vol. 43/172-173, pp. 233-246.

- 5) Kirsch-Volders, M., *et al.* (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 35/3, pp. 167-172.
- 6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, vol. 2/5, pp. 1084-1104.
- 7) Fenech, M., Morley, A.A. (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, vol. 161/2, pp. 193-198.
- 8) Eastmond, D.A., Tucker, J.D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 13/1, pp. 34-43.
- 9) Eastmond, D.A., Pinkel, D. (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research*, vol. 234/5, pp. 9-20.
- 10) Miller, B.M., *et al.* (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, vol. 6/4, pp. 297-302.
- 11) Farooqi, Z., Darroudi, F., Natarajan, A.T. (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis*, vol. 8/4, pp. 329-334.
- 12) Migliore, L., *et al.* (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research*, vol. 319/3, pp. 205-213.
- 13) Norppa, H., Renzi, L., Lindholm, C. (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis*, vol. 8/6, pp. 519-525.
- 14) Eastmond, D.A., Rupa, D.S., Hasegawa, L.S. (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research*, vol. 322/1, pp. 9-20.
- 15) Marshall, R.R., *et al.* (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research*, vol. 372/2, pp. 233-245.
- 16) Zijno, P., *et al.* (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research*, vol. 372/2, pp. 211-219.
- 17) Kirsch-Volders *et al.* (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*, vol. 540/2, pp. 153-163.
- 18) Capítulo B.10 deste anexo: Ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas em mamíferos.
- 19) Lorge, E., *et al.* (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*, vol. 607/1, pp. 13-36.
- 20) Clare, G., *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research*, vol. 607/1, pp. 37-60.
- 21) Aardema, M.J., *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. III. Using CHO cells. *Mutation Research*, vol. 607/1, pp. 61-87.
- 22) Wakata, A., *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research*, vol. 607/1, pp. 88-124.

- 23) Oliver, J., *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. V. Using L5178Y cells. *Mutation Research*, vol. 607/1, pp. 125-152.
- 24) Albertini, S., *et al.* (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research*, vol. 392/1-2, pp. 187-208.
- 25) Miller, B. *et al.* (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, vol. 392/1-2, pp. 45-59.
- 26) Miller, B., *et al.* (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung. *Mutation Research*, vol. 410, pp. 81-116.
- 27) Kalweit, S., *et al.* (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, vol. 439/2, pp. 183-190.
- 28) Kersten, B., *et al.* (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, vol. 445/1, pp. 55-71.
- 29) von der Hude, W., *et al.* (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Research*, vol. 468/2, pp. 137-163.
- 30) Garriott, M.L., Phelps, J.B., Hoffman, W.P. (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, vol. 517/1-2, pp. 123-134.
- 31) Matsushima, T., *et al.* (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, vol. 14/6, pp. 569-580.
- 32) Elhajouji, A., Lorge, E. (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research*, vol. 607/1, pp. 1-152.
- 33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Research*, vol. 702/2, pp. 139-147.
- 34) Hashimoto K., *et al.* (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 59/1, pp. 28-36.
- 35) Honma, M., Hayashi, M. (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 52/5, pp. 373-384.
- 36) Zhang, L.S., *et al.* (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters*, vol. 347/3-4, pp. 105-115.
- 37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. 25.^a reunião do ESAC, 16-17 de novembro de 2006. Disponível em: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- 38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Disponível em: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- 39) Corvi, R., *et al.* (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis*, vol. 23/4, pp. 271-283.

- 40) ILSI (artigo em projeto). Lorge, E., Moore, M.M., Clements, J., O'Donovan, M., Honma, M., Kohara, A., van Benthem, J., Galloway, S., Armstrong, M.J., Sutter, A., Thybaud, V., Gollapudi, B., Aardema, M., Young-Tannir, J. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research*.
- 41) Scott, D., *et al.* (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research*, vol. 257/2, pp. 147-205.
- 42) Morita, T., *et al.* (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, vol. 268/2, pp. 297-305.
- 43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, vol. 8/6, pp. 789-886.
- 44) Long, L.H., *et al.* (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research*, vol. 634/1-2, pp. 177-183.
- 45) Nesslany, F., *et al.* (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation*, vol. 49, pp. 439-452.
- 46) Fenech, M., Morley, A.A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, vol. 147/1-2, pp. 29-36.
- 47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research*, vol. 392, pp. 11-18.
- 48) Payne, C.M., *et al.* (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, vol. 62/6, pp. 825-840.
- 49) Bazin, E., *et al.* (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 51/3, pp. 251-259.
- 50) Le Hegarat, L., *et al.* (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, vol. 25/6, pp. 555-560.
- 51) Josse, R., *et al.* (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, vol. 27/3, pp. 295-304.
- 52) Ehrlich, V., *et al.* (2002). Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, vol. 17/3, pp. 257-260.
- 53) Knasmüller, S., *et al.* (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxins; current state of knowledge. *Toxicology*, vol. 198/1-3, pp. 315-328.
- 54) Gibson, D.P., *et al.* (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research*, vol. 392/1-2, pp. 61-70.
- 55) Bonassi, S., *et al.* (2001). HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes. I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 37/1, pp. 31-45.
- 56) Maron, D.M., Ames, B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, vol. 113/3-4, pp. 173-215.
- 57) Ong, T.-m., *et al.* (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, vol. 4/1, pp. 55-65.

- 58) Elliott, B.M., *et al.* (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, vol. 7, pp. 175-177.
- 59) Matsushima, T., *et al.* (1976). «A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems» in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*. de Serres, F.J., *et al.* (editores), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- 60) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R., Galloway, S.M. (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 28, pp. 51-59.
- 61) PNUA (2001). Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes. Programa das Nações Unidas para o Ambiente (PNUA). Disponível em: <http://www.pops.int/>
- 62) Tucker, J.D., Christensen, M.L. (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, vol.190/3, pp. 225-8.
- 63) Krahn, D.F., Barsky, F.C., McCooey, K.T. (1982). «CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids» in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (editores). Plenum, Nova Iorque, pp. 91-103.
- 64) Zamora, P.O., *et al.* (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, vol. 5/6, pp. 795-801.
- 65) Asakura, M., *et al.* (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, vol. 652/2, pp. 122-130.
- 66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, vol. 285/1, pp. 35-44.
- 67) Phelps, J.B., Garriott, M.L., Hoffman, W.P. (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, vol. 521/1-2, pp. 103-112.
- 68) Kirsch-Volders, M., *et al.* (2004). Corrigendum to «Report from the *in vitro* micronucleus assay working group» *Mutation Research*, 564, 97-100.
- 69) Lorge, E., *et al.* (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research*, vol. 655/1-2, pp. 1-3.
- 70) Surrallés, J., *et al.* (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, vol. 341/3, pp. 169-184.
- 71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, vol. 724, pp. 86-87.
- 72) Pfuhler, S., *et al.* (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, vol. 723/2, pp. 101-107.
- 73) OCDE (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Disponível mediante pedido.
- 74) Morita T., Honma, M., Morikawa, K. (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, vol. 741, pp. 32-56.
- 75) Brookmire L., Chen, J.J., Levy, D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 54/1, pp. 36-43.

- 76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
 - 77) Sobol, Z., et al. (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, vol. 746/1, pp. 29-34.
 - 78) Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M., Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research*, vol. 120/4, pp. 241-247.
 - 79) MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Langlois, R.G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research*, vol. 120/4, pp. 269-275.
 - 80) Bryce, S.M., et al. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 52/4, pp. 280-286.
 - 81) Nicolette, J., et al. (2011). *In vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 52/5, pp. 355-362.
 - 82) Shi, J., Bezabhe, R., Szkudlinska, A. (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, vol. 25/1, pp. 33-40.
 - 83) OCDE (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS). Series on Testing and Assessment, No. 198. OECD Publishing, Paris.
 - 84) Fenech, M., et al. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, vol. 534/1-2, pp. 65-75.
 - 85) Elhajouji, A., Cunha, M., Kirsch-Volders, M. (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, vol. 13/2, pp. 193-8.
 - 86) Kirsch-Volders, M., et al. (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, vol. 85/8, pp. 873-99.
 - 87) Hayashi, M., et al. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 723/2, pp. 87-90.
 - 88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2.^a edição. John Wiley and Sons, Nova Iorque.
 - 89) Hoffman, W.P., Garriott, M.L., Lee, C. (2003). «*In vitro* micronucleus test» in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*. 2.^a edição. Chow, S. (editores), Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, pp. 463-467.
 - 90) Fleiss, J.L., Levin, B., Paik, M.C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 3.^a edição. John Wiley & Sons, Nova Iorque.
 - 91) Galloway, S.M., et al. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
 - 92) Richardson, C., et al. (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. Kirkland, D.J. (editores), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
 - 93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.
-

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Aneugénio: Produto químico ou processo que, por interação com os componentes do aparelho do ciclo mitótico ou meiótico de divisão celular, origina aneuploidia em células ou organismos.

Aneuploidia: Desvio, num único ou em mais cromossomas, mas não por séries completas de cromossomas (poliploidia), do número diploide (ou haploide) normal de cromossomas.

Apoptose: Morte celular programada, caracterizada por uma série de etapas conducentes à desintegração das células em partículas envolvidas por membranas, que são em seguida eliminadas por fagocitose ou excreção.

Proliferação celular: Aumento do número de células por divisão celular mitótica.

Centrómero: Região do ADN de um cromossoma na qual os dois cromátídeos se juntam e à qual os dois cinetócoros estão ligados lado a lado.

Produto químico: Substância ou mistura.

Concentrações: Trata-se das concentrações finais do produto químico no meio de cultura.

Clastogénio: Produto químico ou ocorrência que causa aberrações cromossómicas estruturais em populações celulares ou organismos eucarióticos.

Citocinese: Processo de divisão celular imediatamente após a mitose, conducente à formação de duas células-filhas, cada uma com o seu núcleo.

Índice de proliferação com citocinese bloqueada (em inglês «CBPI», de «*cytokinesis-block proliferation index*»): Proporção de células «segunda divisão» na população tratada, relativamente à amostra de controlo não-tratada (ver a fórmula no apêndice 2).

Citóstase: Inibição do crescimento celular (ver a fórmula no apêndice 2).

Citotoxicidade: No respeitante aos ensaios abrangidos pelo presente método de ensaio e realizados com citocalasina B, define-se «citotoxicidade» como uma redução do índice de proliferação com bloqueio da citocinese (CBPI) ou do índice de replicação (IR) das células tratadas, relativamente à amostra de controlo negativo (ver o ponto 26 e o apêndice 2).

No respeitante aos ensaios abrangidos pelo presente método de ensaio e realizados sem citocalasina B, define-se «citotoxicidade» como uma redução da duplicação da população em termos relativos (RPD) ou do aumento relativo da contagem celular (RICC) das células tratadas, relativamente à amostra de controlo negativo (ver o ponto 27 e o apêndice 2).

Genotóxico: Termo geral que abrange todos os tipos de danos no ADN ou nos cromossomas, incluindo fraturas, supressão de segmentos, aduções, ligações e alterações nucleotídicas, rearranjos, mutações génicas, aberrações cromossómicas e aneuploidia. Nem todos os tipos de efeitos genotóxicos originam mutações ou danos cromossómicos estáveis.

Célula em interfase: Célula que não está na fase mitótica.

Cinetócoro: Estrutura proteica formada no centrómero de um cromossoma, à qual se ligam as fibras fusiformes durante a divisão celular, permitindo o movimento organizado dos cromossomas-filhos para os polos das células-filhas.

Micronúcleo: Pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula e que se adiciona a este, formado durante a telófase da mitose ou meiose por cromossomas inteiros ou fragmentos de cromossoma retardatários.

Mitose: Divisão do núcleo celular, habitualmente subdividida em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase.

Índice mitótico: Relação entre o número de células em metáfase e o número total de células observadas numa população de células; fornece uma indicação do grau de proliferação da população em causa.

Mutagénico: Que produz uma alteração hereditária de sequências de pares de bases do ADN em genes ou da estrutura dos cromossomas (aberrações cromossómicas).

Não-disjunção: Falha de separação de cromátídeos emparelhados, que não são adequadamente segregados para as células-filhas em formação, originando células-filhas com número anormal de cromossomas.

Estado p53: A proteína p53 participa na regulação do ciclo celular, na apoptose e na reparação do ADN. As células com défice de proteína p53 funcional, incapazes de suspender o ciclo celular ou de eliminar as células danificadas por apoptose ou por outros mecanismos (como a indução de reparação do ADN) relacionados com as funções da p53 em resposta a danos no ADN, devem, em teoria, ser mais atreitas a mutações genéticas ou a aberrações cromossómicas.

Poliploidia: Aberrações cromossómicas numéricas em células ou organismos, que abrangem uma ou mais séries completas de cromossomas — por oposição à aneuploidia, que abrange um ou mais cromossomas.

Índice de proliferação (IP): Método de medição da citotoxicidade quando não se utiliza citocalasina B (ver a fórmula no apêndice 2).

Aumento relativo da contagem celular (em inglês «RICC», de «relative increase in cell count»): Método de medição da citotoxicidade quando não se utiliza citocalasina B (ver a fórmula no apêndice 2).

Duplicação da população em termos relativos (em inglês «RPD», de «relative population doubling»): Método de medição da citotoxicidade quando não se utiliza citocalasina B (ver a fórmula no apêndice 2).

Índice de replicação (IR): Razão entre o número de ciclos de divisão celular completados numa cultura tratada e na amostra de controlo não-tratada, durante o período de exposição e de recuperação (ver a fórmula no apêndice 2).

Fração S9 de fígado: Sobrenadante após centrifugação do homogeneizado de fígado a 9000 g (extrato de fígado em bruto).

Mistura S9: Mistura de fração S9 de fígado e cofatores necessários à atividade enzimática metabólica.

Amostra de controlo do solvente: Termo geral que define as culturas de controlo tratadas apenas com o solvente utilizado para dissolver o produto químico em estudo.

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

Amostra de controlo não-tratada: Cultura não sujeita a qualquer tratamento (com um produto químico em estudo ou solvente), mas processada simultaneamente e do mesmo modo que as culturas tratadas com o produto químico em estudo.

Apêndice 2

FÓRMULAS DE QUANTIFICAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Caso se utilize citocalasina B, a citotoxicidade é avaliada com base no **índice de proliferação com citocinese bloqueada (CBPI)** ou no **índice de replicação (IR)** (17) (69). O primeiro indica o número médio de núcleos por célula, podendo ser utilizado para calcular a proliferação celular. O índice de replicação indica a relação entre o número de ciclos celulares por célula durante o período de exposição à citocalasina B nas culturas tratadas e nas culturas de controlo, podendo ser utilizado para calcular a percentagem de citóstase:

$$\text{Percentagem de citóstase} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

em que:

T = se refere à cultura tratada com o produto químico em estudo,

C = se refere às culturas de controlo

e:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{n.º de células mononucleadas}) + (2 \times \text{n.º de células binucleadas}) + (3 \times \text{n.º de células plurinucleadas}))}{(\text{número total de células})}$$

Por conseguinte, se o CBPI for igual a 1 (todas as células mononucleadas), a citóstase é de 100 %.

$$\text{Citóstase} = 100 - \text{IR}$$

$$\text{IR} = \frac{((\text{n.º de células binucleadas}) + (2 \times \text{n.º de células plurinucleadas})) / (\text{n.º total de células})_T}{((\text{n.º de células binucleadas}) + (2 \times \text{n.º de células plurinucleadas})) / (\text{n.º total de células})_C} \times 100$$

T = culturas tratadas,

C = culturas de controlo.

Por conseguinte, se o IR for de 53 %, em termos numéricos apenas 53 % das células que se dividiram para formar células binucleadas e plurinucleadas na cultura de controlo se dividiram na cultura tratada — o que corresponde a 47 % de citóstase.

Caso não se utilize citocalasina B, recomenda-se a avaliação da citotoxicidade com base no **aumento relativo da contagem celular (RICC)** ou na **duplicação da população em termos relativos (RPD)** (69), pois ambos os parâmetros têm em conta a proporção das células que sofreram divisão na população celular.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{Aumento do número de células nas culturas tratadas}(\text{final-inicial}))}{(\text{Aumento do número de células nas culturas de controlo}(\text{final-inicial}))} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{Número de duplicações de população nas culturas tratadas})}{(\text{Número de duplicações de população nas culturas de controlo})} \times 100$$

em que:

$$\text{Duplicação da população} = [\log (\text{n.º de células após tratamento} \div \text{n.º inicial de células})] \div \log 2$$

A um RICC ou RPD de 53 % corresponde, pois, uma citotoxicidade/citóstase de 47 %.

Mediante o **índice de proliferação (IP)**, pode quantificar-se a citotoxicidade por contagem do número de clones constituídos por 1 célula (cl1), 2 células (cl2), 3 a 4 células (cl4) e 5 a 8 células (cl8):

$$\text{IP} = \frac{((1 \times \text{cl1}) + (2 \times \text{cl2}) + (3 \times \text{cl4}) + (4 \times \text{cl8}))}{(\text{cl1} + \text{cl2} + \text{cl4} + \text{cl8})}$$

O índice de proliferação tem sido utilizado como parâmetro fiável e efetivo de citotoxicidade também para linhagens celulares cultivadas *in vitro* sem citocalasina B (35) (36) (37) (38), podendo ser encarado como parâmetro adicional útil.

Em qualquer caso, o número de células antes do tratamento deve ser igual nas culturas tratadas e nas culturas de controlo negativo.

Embora o RCC (isto é, número de células nas culturas tratadas/número de células nas culturas de controlo) tenha sido utilizado como parâmetro de citotoxicidade, deixou de ser recomendado, uma vez que pode subestimar a citotoxicidade.

Quando se utilizam sistemas de contagem automáticos (por exemplo citometria de fluxo, citometria de varrimento por laser ou análise de imagem), pode substituir-se na fórmula o número de células pelo número de núcleos.

Nas culturas de controlo negativo, a duplicação da população e o índice de replicação devem ser compatíveis com a exigência de que a colheita de células após o tratamento ocorra no termo de um período equivalente a cerca de 1,5 a 2,0 vezes a duração normal do ciclo celular.»

15) Na parte B, são aditados os seguintes capítulos:

«B.59 Sensibilização cutânea *in chemico*: ensaio de reatividade direta de péptidos (DPRA)

INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline 442C* (2015) da OCDE. Sensibilizante cutâneo é uma substância que provoca reação alérgica por contacto com a pele, conforme a definição do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS) (1) e pelo Regulamento (CE) n.º 1272/2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas ⁽¹⁾ (CRE). O presente método de ensaio descreve um procedimento *in chemico* (ensaio de reatividade direta de péptidos — DPRA, do inglês *Direct Peptide Reactivity Assay*) a utilizar para a distinção entre sensibilizantes e não-sensibilizantes cutâneos, em conformidade com o GHS da ONU e com o CRE.

Há consenso sobre os principais eventos biológicos subjacentes à sensibilização cutânea. Os conhecimentos atuais sobre os mecanismos químicos e biológicos associados à sensibilização cutânea foram sintetizados na forma de uma via determinante dos efeitos adversos (AOP — *Adverse Outcome Pathway*) (2), desde o evento molecular iniciador, passando pelos eventos intermédios, até ao efeito adverso, designadamente o surgimento de dermatites alérgicas de contacto em seres humanos ou hipersensibilidade de contacto em roedores. Na AOP de sensibilização cutânea, o evento molecular iniciador é constituído pela ligação covalente das substâncias eletrófilas aos centros nucleófilos das proteínas da pele.

A determinação da sensibilização cutânea tem normalmente utilizado animais de laboratório. Os métodos clássicos que utilizam porquinhos-da-índia — ensaio de maximização de Magnusson Kligman com porquinhos-da-índia (GMPT) e ensaio de Buehler (TM B.6 (3)) — estudam as fases de indução e de desencadeamento da sensibilização cutânea. Ganham também aceitação um ensaio de gânglios linfáticos locais com murídeos (LLNA, TM B. 42 (4)) e duas alterações deste sem recurso a isótopos radioativos — LLNA: DA (TM B.50 (5)) e LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (6)) —, que determinam exclusivamente a resposta indutiva, uma vez que apresentam vantagem em relação aos ensaios com porquinhos-da-índia no tocante ao bem-estar animal e proporcionam uma medição objetiva da fase de indução da sensibilização cutânea.

Em tempos mais recentes, foram considerados cientificamente válidos para a avaliação do risco de sensibilização cutânea dos produtos químicos métodos de ensaio *in chemico* e *in vitro* de abordagem determinista. Todavia, serão necessárias combinações de métodos de ensaio que não envolvam animais (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*), no âmbito de abordagens integradas de ensaio e avaliação (IATA — *Integrated Approaches to Testing and Assessment*), para substituir na íntegra os ensaios com animais utilizados atualmente, devido à abrangência determinista limitada da AOP, no que respeita aos métodos de ensaio atualmente disponíveis sem recurso a animais (2) (7).

⁽¹⁾ 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).

Propõe-se o método DPRA para estudar o evento molecular iniciador da sensibilização cutânea, designadamente a reatividade das proteínas, quantificando a reatividade dos produtos químicos em estudo em função de péptidos-modelo sintéticos que contêm lisina ou cisteína (8). Utilizam-se os valores percentuais de consumo da cisteína e da lisina dos péptidos para classificar a substância em uma de quatro categorias de reatividade, de forma a distinguir os sensibilizantes e os não-sensibilizantes cutâneos (9).

O método DPRA foi avaliado num estudo de validação liderado pelo laboratório de referência da União Europeia para as alternativas à experimentação em animais (EURL ECVAM) e posteriormente objeto de uma análise independente inter pares pelo Comité Científico Consultivo do ECVAM (ESAC), sendo considerado cientificamente válido (10) para utilização como IATA para a distinção entre sensibilizantes e não-sensibilizantes cutâneos, com vista à classificação e à rotulagem em matéria de perigos. As referências (11) (12) (13) e (14) apresentam exemplos da utilização de dados DPRA, juntamente com outras informações.

O apêndice I contém definições.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS, APLICABILIDADE E LIMITAÇÕES

A correlação entre a reatividade das proteínas e o potencial de sensibilização cutânea está bem estabelecida — (15) (16) e (17). No entanto, uma vez que a ligação às proteínas representa apenas um evento importante (embora seja o evento molecular iniciador da AOP de sensibilização cutânea), a informação sobre a reatividade das proteínas decorrente dos ensaios e da aplicação de métodos sem ensaios pode não bastar, por si só, para concluir da ausência de potencial de sensibilização cutânea das substâncias químicas. Por conseguinte, os dados obtidos com este método de ensaio devem ser ponderados no contexto de abordagens integradas, como a IATA, e combinados com outras informações complementares, decorrentes, por exemplo, de ensaios *in vitro* respeitantes a outros eventos importantes da AOP de sensibilização cutânea, bem como métodos sem ensaios que incluem a interpolação com base em dados relativos a produtos químicos análogos.

Este método de ensaio, juntamente com outros dados complementares, pode ser utilizado para distinção entre os sensibilizantes cutâneos (categoria 1 do sistema GHS/CRE) e os não-sensibilizantes, no contexto da IATA. Não pode ser utilizado isoladamente, nem para classificar os sensibilizantes cutâneos nas subcategorias 1A e 1B do GHS, nem para estabelecer o potencial de sensibilização no contexto de avaliações de segurança. Todavia, consoante o quadro regulamentar, um resultado positivo com o DPRA pode ser utilizado, por si só, para classificar uma substância na categoria 1 do sistema GHS/CRE.

Demonstrou-se que o método de ensaio DPRA é aplicável em laboratórios com experiência em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O nível de reprodutibilidade das previsões expectáveis para o método de ensaio é da ordem de 85 % a nível intralaboratorial e 80 % a nível interlaboratorial (10). Os resultados obtidos no estudo de validação (18) e os estudos publicados (19) indicam, de forma geral, que a precisão do método para distinguir os sensibilizantes (categoria 1 do GHS/CRE) dos não-sensibilizantes é de 80 % (N=157), sendo a sensibilidade de 80 (88/109) e a especificidade de 77 % (37/48), relativamente aos resultados obtidos com o LLNA. O DPRA é mais suscetível de subprever produtos químicos com potencial baixo a moderado de sensibilização cutânea (subcategoria 1B do GHS/CRE) do que produtos químicos com potencial elevado (subcategoria 1A do GHS/CRE) — (18) e (19). Contudo, os valores de precisão apresentados para o DPRA utilizado de forma independente são meramente indicativos, dado que o método de ensaio deve ser tido em conta em combinação com outras fontes de informação no contexto de uma IATA, em conformidade com o disposto no ponto 9. Além disso, na avaliação de métodos de ensaio de sensibilização cutânea que não utilizem animais, deve ter-se em mente que o método LLNA e outros ensaios com animais podem não refletir de forma adequada a reação da espécie-alvo (a saber, a espécie humana). Com base nos dados globais disponíveis, considera-se o DPRA aplicável a produtos químicos em estudo que abrangem uma grande variedade de grupos funcionais orgânicos, mecanismos de reação, potenciais de sensibilização cutânea (determinados em estudos *in vivo*) e propriedades físico-químicas (8) (9) (10) e (19). No seu conjunto, estas informações indicam a utilidade do DPRA para a identificação de riscos de sensibilização cutânea.

O termo «produto químico em estudo» utilizado neste método de ensaio, refere-se ao produto que é objeto do ensaio e não à aplicabilidade do DPRA ao ensaio de substâncias e/ou misturas. O presente método não é aplicável à análise de compostos metálicos, visto saber-se que estes reagem com proteínas por mecanismos que não implicam ligações covalentes. O produto químico em estudo é dissolvido num solvente adequado, de forma a obter-se uma concentração final de 100 mM (ver ponto 18). No entanto, os produtos químicos em estudo que não forem solúveis a esta concentração podem ser ensaiados a concentrações solúveis mais baixas. Nesse caso, um resultado positivo pode, mesmo assim, ser utilizado para apoiar a identificação do produto químico em estudo como sensibilizante cutâneo, mas um resultado negativo não permite chegar a nenhuma conclusão definitiva quanto à ausência de reatividade. Atualmente, dispõe-se de poucas informações sobre a aplicabilidade do método DPRA a misturas de composição conhecida — (18) e (19). O método considera-se, porém, tecnicamente aplicável ao ensaio de substâncias multicomponentes e misturas de composição conhecida (ver ponto 18). Antes da aplicação do método a uma mistura para obter dados com fins regulamentares, importa ponderar se (e, em caso afirmativo, por que motivo) o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Tais considerações não são necessárias se houver um requisito regulamentar para o ensaio da mistura. O atual modelo de previsão não pode ser utilizado para misturas complexas de composição desconhecida nem para substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos (ou seja, substâncias UVCB), devido à razão molar definida entre o produto químico em estudo e o péptido. Para o efeito, terá de ser desenvolvido um novo modelo de previsão baseado num método gravimétrico. Se houver provas de que não é aplicável a outras categorias específicas de produtos químicos, o método de ensaio não deve ser utilizado para essas categorias.

O presente método de ensaio *in chemico* não inclui nenhum sistema metabólico. Os produtos químicos que exigem bioativação enzimática para exercerem o seu potencial de sensibilização cutânea (pro-haptenos) não são detetáveis por este método. Em alguns casos documentados, os produtos químicos que se tornam sensibilizantes após transformação abiótica (pré-haptenos) podem ser corretamente detetados pelo método de ensaio (18). Atendendo ao que precede, os resultados negativos obtidos com o método de ensaio devem ser interpretados no contexto das referidas limitações e à luz de outras fontes de informação no âmbito de uma IATA. Os produtos químicos em estudo que não se liguem ao péptido por ligações covalentes mas promovam a sua oxidação (ou seja, a dimerização da cisteína) podem conduzir a uma eventual sobrestimativa do consumo do péptido, resultando em possíveis resultados positivos falsos e/ou na atribuição de uma classe de reatividade superior (ver pontos 29 e 30).

Como já referido, o método DPRA contribui para distinguir os sensibilizantes dos não-sensibilizantes cutâneos. Pode, todavia, contribuir também para a avaliação do potencial sensibilizante (11), quando utilizado em abordagens integradas, como a IATA. São necessários estudos complementares, de preferência com base em dados humanos, para determinar de que modo os resultados do método DPRA podem ajudar a avaliar o potencial de sensibilização.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O DPRA é um método *in chemico* que quantifica a concentração remanescente de péptido de cisteína ou lisina após 24 horas de incubação com o produto químico em estudo, a $25 \pm 2,5$ °C. Os péptidos sintéticos contêm fenilalanina (auxiliar da deteção). A concentração relativa dos péptidos é determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com gradiente de eluição e deteção UV a 220 nm. As percentagens de consumo de péptido de cisteína e lisina são calculadas e utilizadas num modelo de previsão (ver ponto 29) que permite atribuir ao produto químico em estudo uma das quatro classes de reatividade utilizadas para distinguir os sensibilizantes dos não-sensibilizantes cutâneos.

Antes de passarem a utilizar, por rotina, o método descrito, os laboratórios terão de demonstrar a sua competência técnica, utilizando para o efeito as dez substâncias de referência indicadas no apêndice 2.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Este método de ensaio baseia-se no protocolo n.º 154 DB-ALM DPRA (20), utilizado no estudo de validação coordenado pelo EURL-ECVAM. Recomenda-se que seja utilizado para aplicação laboratorial. Apresenta-se a seguir uma descrição dos principais componentes e procedimentos do método DPRA. Se se utilizar um sistema diferente de HPLC, é necessário demonstrar a sua equivalência com o sistema validado descrito no protocolo DB-ALM (p. ex., através de ensaios com as substâncias de referência constantes do apêndice 2).

Preparação dos péptidos de cisteína ou lisina

Imediatamente antes de incubação com o produto químico em estudo, preparam-se soluções-mãe de cisteína (Ac-RFAACAA-COOH) e lisina (Ac-RFAAKAA-COOH) que contenham péptidos sintéticos de pureza superior a 85 % e, de preferência, na gama 90-95 %. A concentração final de péptido com cisteína deve ser de 0,667 mM, em tampão de fosfatos a pH 7,5, e a concentração final de péptido de lisina deve ser de 0,667 mM, em tampão de acetato de amónio a pH 10,2. Deve estabelecer-se a sequência das análises por HPLC de modo a que o tempo de análise seja inferior a 30 horas. No sistema de HPLC utilizado no estudo de validação e descrito no presente método de ensaio, podem realizar-se numa única sequência até 26 amostras em análise (produto químico em estudo, amostra de controlo positivo e um número adequado de controlos com solvente, em função do número de solventes utilizados no ensaio, cada um em triplicado). Os replicados analisados na mesma série devem todos utilizar as mesmas soluções-mãe de péptidos de cisteína e lisina. Recomenda-se verificar a solubilidade de cada lote de péptidos antes da sua utilização.

Preparação do produto químico em estudo

Antes do ensaio, deve determinar-se a solubilidade da substância em estudo num solvente adequado, por recurso ao procedimento descrito no protocolo DPRA DB-ALM (20). Um solvente adequado é aquele que dissolve completamente o produto químico em estudo. Uma vez que, no método DPRA, o produto químico em estudo é incubado em grande excesso com os péptidos de cisteína ou lisina, a verificação visual da formação de uma solução límpida é considerada suficiente para determinar que se dissolveram quer o produto químico em causa quer todos os seus componentes (no caso do ensaio de uma substância ou mistura multicomponentes). Os solventes adequados são o acetonitrilo, a água, uma mistura água-acetonitrilo (1:1), o isopropanol, a acetona ou uma mistura acetona-acetonitrilo (1:1). Podem utilizar-se outros solventes, desde que não tenham impacto na estabilidade do péptido, determinada com controlos de referência C (ou seja, amostras constituídas simplesmente pelo péptido dissolvido no solvente adequado; ver o anexo 3). Como última opção, se o produto químico em estudo não for solúvel em nenhum destes solventes, deve tentar-se solubilizá-lo em 300 µl de DMSO e diluir a solução resultante com 2 700 µl de acetonitrilo; se o produto não for solúvel nesta mistura, deve tentar-se solubilizar idêntica quantidade do mesmo em 1 500 µl de DMSO e diluir a solução resultante com 1 500 µl de acetonitrilo. O produto químico em estudo deve ser previamente tarado num frasco de vidro e, imediatamente antes do ensaio, dissolvido num solvente adequado para preparar uma solução 100 mM. No caso das misturas e das substâncias multicomponentes de composição conhecida, deve estabelecer-se um único grau de pureza através do somatório da proporção dos seus componentes (excluindo a água), determinando-se uma única massa molecular aparente tendo em conta as massas moleculares de cada componente na mistura (excluindo a água) e as suas respetivas proporções. A pureza e a massa molecular aparente assim obtidas devem ser utilizadas para calcular a massa de produto químico necessária para preparar uma solução 100 mM. No caso dos polímeros, cuja massa molecular predominante não pode ser determinada, pode ser tida em conta, para preparar uma solução 100 mM, a massa molecular do monómero (ou a massa molecular aparente dos vários monómeros constituintes do polímero). Contudo, ao ensaiar misturas, substâncias multicomponentes ou polímeros de composição conhecida, deve ponderar-se igualmente o ensaio do produto químico puro. No caso dos líquidos, o produto químico deve ser ensaiado sem qualquer diluição prévia, por incubação com os péptidos de cisteína e lisina a uma razão molar de 1:10 e 1:50, respetivamente. No caso dos sólidos, o produto químico em estudo deve ser dissolvido até à máxima concentração solúvel no mesmo solvente utilizado para preparar a solução de concentração aparente 100 mM. Deve então ensaiar-se sem qualquer outra diluição, por incubação com os péptidos de cisteína e lisina a uma razão molar de 1:10 e 1:50, respetivamente. A obtenção de resultados concordantes (reatividade ou não) entre a solução de concentração aparente 100 mM e o produto químico puro deve permitir chegar a uma conclusão definitiva quanto ao resultado.

Preparação das amostras de controlo positivo, referência e coeluição

Como controlo positivo, deve utilizar-se aldeído cinâmico (n.º CAS 104-55-2; grau de pureza ≥ 95 %, de qualidade alimentar) com uma concentração de 100 mM em acetonitrilo. Podem utilizar-se outros controlos positivos adequados, de preferência com valores de consumo numa gama média, se houver dados históricos que permitam definir critérios de aceitação comparáveis. Devem ainda incluir-se na sequência de análise por HPLC controlos de referência (ou seja, amostras que contenham apenas o péptido dissolvido num solvente adequado), utilizadas para verificar a adequação do sistema de HPLC antes da análise (controlos de referência A) e a estabilidade do controlo de referência ao longo do tempo (controlos de referência B), bem como se o solvente utilizado para dissolver o produto químico em estudo não contribui para o consumo de péptidos (controlos de referência C) (ver apêndice 3). O controlo de referência adequado para cada produto químico serve para calcular a percentagem de consumo de péptidos no respeitante a esse produto (ver ponto 26). Deve também incluir-se na sequência um controlo de coeluição, constituído apenas pelo produto químico em estudo, para cada um destes produtos analisados, com vista a detetar a possível coeluição do produto químico com o péptido de lisina ou de cisteína.

Incubação do produto químico em estudo com as soluções de péptidos de cisteína e lisina

As soluções de péptidos de cisteína e lisina devem ser incubadas com o produto químico em frascos de autoamostragem de vidro, nas proporções de 1:10 e 1:50, respetivamente. Se se observar um precipitado imediatamente após a adição da solução do produto químico em estudo à solução de péptidos, devido a uma baixa solubilidade do produto em água, não é possível conhecer com exatidão a quantidade do produto químico em estudo remanescente na solução para reagir com o péptido. Nesse caso, os resultados positivos podem ser aproveitados, mas os resultados negativos são equívocos e devem interpretar-se com os devidos cuidados (ver também o disposto no ponto 11 para o ensaio de produtos químicos insolúveis até uma concentração de 100 mM). A solução de reação deve ser deixada ao abrigo da luz, a $25 \pm 2,5$ °C durante 24 ± 2 h, antes de realizar a análise por HPLC. Cada produto químico em estudo deve ser analisado em triplicado, para a determinação de ambos os péptidos. As amostras têm de ser inspecionadas visualmente antes da análise por HPLC. Caso se observe a formação de um precipitado ou uma separação de fases, as amostras podem ser centrifugadas a baixa velocidade (100-400 g), para depositar o precipitado no fundo do frasco, a título de precaução, uma vez que grandes quantidades de precipitado podem danificar os tubos ou as colunas do sistema de HPLC. Se se observar uma precipitação ou uma separação de fases após o período de incubação, o consumo de péptidos pode ser subestimado, não sendo possível concluir, com certeza suficiente, a ausência de reação, em caso de resultado negativo.

Preparação da curva de calibração para HPLC

Deve obter-se uma curva de calibração para os péptidos de cisteína e de lisina. As soluções-padrão de péptidos são preparadas numa solução a 20 % ou 25 % de acetonitrilo e tampão de fosfatos (pH 7,5), no caso do péptido de cisteína, e de tampão de acetato de amónio (pH 10,2), no caso do péptido de lisina. Utilizando diluições-padrão em série da solução-mãe de péptidos (0,667 mM), preparam-se seis soluções de calibração que cubram a gama de 0,534 a 0,0167 mM. Deve também incluir-se na curva de calibração uma amostra em branco do tampão de diluição. As curvas de calibração adequadas devem ter um parâmetro $r^2 > 0,99$.

Preparação e análise por HPLC

Importa verificar a adequação do sistema de HPLC antes de se efetuar a análise. O consumo de péptidos é monitorizado por HPLC associada a um detetor de UV (detetor de fotodíodos ou detetor de absorvância com 220 nm de comprimento de onda fixo). É instalada no sistema de HPLC uma coluna adequada. O dispositivo de HPLC descrito no protocolo validado utiliza uma coluna Zorbax SB-C-18 2,1 mm $\times$ 100 mm $\times$ 3,5 μ m. Com esta coluna de HPLC de fase reversa, o sistema, na sua totalidade, deve ser equilibrado, a 30 °C, com 50 % de fase A (solução aquosa de ácido trifluoroacético a 0,1 % (v/v)) e 50 % de fase B (solução de ácido trifluoroacético em

acetonitrilo a 0,085 % (v/v)) durante, pelo menos, 2 horas antes da análise. A análise por HPLC deve utilizar um caudal de 0,35 ml/min e um gradiente linear de 10 % a 25 % de acetonitrilo durante 10 minutos, seguida de um rápido aumento para 90 % de acetonitrilo, com vista a eliminar as outras matérias. Devem injetar-se volumes iguais de cada padrão, amostra e controlo. A coluna deve ser reequilibrada para as condições iniciais a cada 7 minutos, entre as injeções. Caso se utilize uma coluna de HPLC de fase reversa, os parâmetros de ensaio atrás descritos podem ter de ser ajustados para garantir eluição e integração adequadas dos péptidos de cisteína e lisina, ajustamento esse que inclui o volume de injeção, variável consoante o sistema utilizado (normalmente na gama 3-10 µl). Se se utilizar um sistema diferente de HPLC, é essencial demonstrar a sua equivalência com o sistema validado atrás descrito (p. ex., testando as substâncias de referência constantes do apêndice 2). A absorvância é medida a 220 nm. Caso se utilize um detetor de fotodíodos, deve registar-se também a absorvância a 258 nm. Importa salientar que alguns lotes de acetonitrilo podem ter impacto negativo na estabilidade dos péptidos, devendo, por isso, avaliar-se este parâmetro quando se utiliza um novo lote de acetonitrilo. A relação entre a área do pico a 220 nm e a área do pico a 258 nm pode ser utilizada como indicador de coeluição. Em cada amostra, uma relação entre as áreas dos picos compreendida, em média ⁽¹⁾, entre 90 % e 100 % (90 % < 100 %) constitui um bom indício de que não ocorreu coeluição.

Alguns produtos químicos em estudo podem promover a oxidação do péptido de cisteína. O pico do péptido de cisteína dimerizada pode ser monitorizado visualmente. Caso se afigure ter ocorrido dimerização, esse facto deve ser registado, pois a percentagem de consumo de péptido poderá estar sobrestimada, levando a falsas estimativas de resultados positivos e/ou à atribuição de uma classe de reatividade mais elevada (ver pontos 29 e 30).

A análise por HPLC dos péptidos de cisteína e lisina pode ser realizada simultaneamente (caso se disponha de dois sistemas de HPLC) ou em dias diferentes. Se a análise for realizada em dias diferentes, todas as soluções do produto químico em estudo devem ser preparadas diariamente, para ambos os ensaios. A análise deve ser programada de forma a garantir que a injeção da primeira amostra ocorre 22 a 26 horas após a mistura do produto químico em estudo com a solução de péptido. A sequência das análises por HPLC deve ser estabelecida de modo a que o tempo de análise seja inferior a 30 horas. Com a configuração de HPLC utilizada no ensaio de validação e descrita no presente método de ensaio, podem ser analisadas até 26 amostras num único ensaio de HPLC (ver igualmente o ponto 17). O apêndice 3 apresenta um exemplo de sequência da análise por HPLC.

DADOS E RELATÓRIO

Avaliação dos dados

A concentração de péptido de cisteína ou lisina de cada amostra é determinada por fotometria a 220 nm, medindo a área dos picos respetivos (área delimitada pela curva) e calculando a concentração de péptido através da curva de calibração linear derivada dos padrões.

A percentagem de consumo dos péptidos em cada amostra é determinada medindo a área dos picos e dividindo-a pela área média dos picos dos controlos de referência C pertinentes (ver apêndice 3), de acordo com a fórmula que se segue.

$$\text{de consumo de péptido} = \left[1 - \left(\frac{\text{Área do pico do péptido na injeção do replicado}}{\text{Média das áreas dos picos dos péptidos nos controlos de referência C}} \right) \right] \times 100$$

CrITÉRIOS de aceitação

Para que os resultados de um ensaio sejam considerados válidos, devem ser satisfeitos os seguintes critérios:

- a) A curva de calibração deve ter um parâmetro $r^2 > 0,99$.

⁽¹⁾ No presente documento, o termo «média» designa a média aritmética.

- b) A percentagem média de consumo do péptido nos três replicados, para o controlo positivo com aldeído cinâmico, deve situar-se entre 60,8 % e 100 %, no caso do péptido de cisteína, e entre 40,2 % e 69,0 %, no caso do péptido de lisina; o desvio-padrão máximo para os replicados do controlo positivo deve ser < 14,9 %, no caso da percentagem de consumo de cisteína, e < 11,6 %, no caso da percentagem de consumo de lisina, e
- c) A concentração média de péptidos nos controlos de referência A deve ser de $0,50 \pm 0,05$ mM e o coeficiente de variação das áreas dos picos dos péptidos, para os nove controlos de referência B e C em acetonitrilo, deve ser < 15,0 %.

Se uma ou mais destas condições não forem satisfeitas, o ensaio deve ser repetido.

Para que os resultados obtidos com um dado produto químico sejam considerados válidos, devem ser satisfeitos os seguintes critérios:

- a) Para os replicados do produto químico em estudo, o desvio-padrão máximo deve ser < 14,9 %, no respeitante à percentagem de consumo de cisteína, e < 11,6 %, no respeitante à percentagem de consumo de lisina,
- b) A concentração média de péptidos na solução dos três controlos de referência C no solvente adequado deve ser de $0,50 \pm 0,05$ mM. Se estes critérios não forem cumpridos, os dados devem ser rejeitados, repetindo-se o ensaio para esse produto químico.

Modelo de previsão

Para cada produto químico em estudo, calcula-se a percentagem média de consumo de cisteína e de lisina. No cálculo dessa média, um consumo negativo é considerado «0». Utilizando o modelo de previsão cisteína 1:10/ lisina 1:50, que consta do quadro 1, utiliza-se o limiar de 6,38 % do consumo médio de péptidos para distinguir os sensibilizadores dos não-sensibilizadores cutâneos, no âmbito da IATA. A aplicação do modelo de previsão para atribuir uma classe de reatividade (baixa, média ou elevada) a um produto químico em estudo pode revelar-se útil na avaliação do potencial de sensibilização do mesmo no quadro da IATA.

Quadro 1

Modelo de previsão ⁽¹⁾ cisteína 1:10/ lisina 1:50

Percentagem média de consumo de cisteína e de lisina	Classe de reatividade	Previsão DPRA ⁽²⁾
$0 \% \leq \% \text{ média de consumo} \leq 6,38 \%$	Pouca ou nenhuma reatividade	Negativa
$6,38 \% < \% \text{ média de consumo} \leq 22,62 \%$	Reatividade baixa	Positiva
$22,62 \% < \% \text{ média de consumo} \leq 42,47 \%$	Reatividade moderada	
$42,47 \% < \% \text{ média de consumo} \leq 100 \%$	Reatividade elevada	

⁽¹⁾ Os números referem-se a valores-limiar gerados estatisticamente, e não à precisão da medição.

⁽²⁾ Deve ser ponderada uma previsão DPRA no âmbito de uma abordagem IATA, em conformidade com os pontos 9 e 12.

Em alguns casos, o produto químico em estudo (substância ou um ou vários componentes de uma substância ou mistura multicomponentes) apresenta uma absorvância significativa a 220 nm e tem o mesmo tempo de retenção do péptido (coeluição). O problema da coeluição pode ser resolvido mediante uma ligeira adaptação do sistema de HPLC, de modo a espaçar os tempos de eluição do produto químico em estudo e do péptido. Se se utilizar um sistema diferente de HPLC para resolver o problema da coeluição, deve demonstrar-se a sua equivalência com o sistema validado (p. ex., testando as substâncias de referência constantes do apêndice 2). Quando ocorre coeluição, o pico do péptido não pode ser integrado, o que torna impossível calcular a percentagem de péptido consumido. Caso se observe coeluição nos ensaios com os péptidos de cisteína e de lisina, as respetivas análises devem ser classificadas como «inconclusivas». Se ocorrer coeluição apenas com o péptido de lisina, pode utilizar-se o modelo de previsão cisteína 1:10 que consta do quadro 2.

Quadro 2

Modelo de previsão ⁽¹⁾ cisteína 1:10

% de cisteína (cys) consumida	Classe de reatividade	Previsão DPRA ⁽²⁾
0 % ≤ % de consumo de Cys ≤ 13,89 %	Pouca ou nenhuma reatividade	Negativa
13,89 % < % de consumo de Cys ≤ 23,09 %	Reatividade baixa	Positiva
23,09 % < % de consumo de Cys ≤ 98,24 %	Reatividade moderada	
98,24 % < % de consumo de Cys ≤ 100 %	Reatividade elevada	

⁽¹⁾ Os números referem-se a valores-limiar gerados estatisticamente, e não à precisão da medição.

⁽²⁾ Deve ser ponderada uma previsão DPRA no âmbito de uma abordagem IATA, em conformidade com os pontos 9 e 12.

Poderá haver casos em que a sobreposição dos tempos de retenção do produto químico em estudo e de péptidos seja incompleta. Nesses casos, as percentagens de consumo de péptido podem ser estimadas e utilizadas no modelo de previsão cisteína 1:10/ lisina 1:50, embora não seja possível atribuir, com precisão, uma classe de reatividade ao produto químico em estudo.

Se o resultado for inequívoco, bastará uma única análise por HPLC do péptido de cisteína e de lisina para um dado produto químico em estudo. Contudo, se os resultados forem próximos do limiar utilizado para distinguir os resultados positivos dos negativos (ou seja, se forem pouco conclusivos), pode ser necessário realizar ensaios adicionais. Se a percentagem média de consumo se situar na gama de 3 % a 10 % no caso do modelo de previsão cisteína 1:10/ lisina 1:50, ou na gama de 9 % a 17 % no caso do modelo de previsão cisteína 1:10, deve ponderar-se a realização de uma segunda série de ensaios, bem como de uma terceira, caso se obtenham resultados discordantes nas duas primeiras.

Relatório de ensaio

O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações

Produto químico em estudo

— Substância monocomponente

— Dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros elementos;

- Aspeto físico, solubilidade em água, solubilidade em água, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se conhecidas;
 - Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
 - Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
 - Concentrações ensaiadas;
 - Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.
- Substância multicomponentes, UVCB e mistura:
- Caracterização, tanto quanto possível — por exemplo, por identidade química (ver *supra*), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver *supra*) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;
 - Aspeto físico, solubilidade em água, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas relevantes, se disponíveis;
 - Massa molecular, ou massa molecular aparente no caso de misturas/polímeros de composições conhecidas, ou outras informações relevantes para a realização do estudo;
 - Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
 - Concentrações ensaiadas;
 - Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.

Grupos de controlo

- Controlo positivo
- Dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros elementos;
 - Aspeto físico, solubilidade em água, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se conhecidas;
 - Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
 - Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
 - Concentrações ensaiadas;
 - Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
 - Referência ao historial dos resultados dos controlos positivos que demonstrem o cumprimento dos critérios de aceitação, se aplicável.
- Solvente/veículo
- Solvente/veículo utilizado e proporção dos seus componentes, se aplicável;
 - Dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS e/ou outros elementos;
 - Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
 - Aspeto físico, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, caso sejam utilizados solventes/veículos diversos dos referidos no método de ensaio, na medida em que essas informações sejam conhecidas;
 - Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

- Justificação da escolha do solvente, para cada produto químico em estudo;
- No respeitante ao acetonitrilo, resultados do ensaio de impacto na estabilidade dos péptidos.

Preparação dos péptidos, do controlo positivo e do produto químico em estudo

- Caracterização das soluções de péptidos (fornecedor, lote, massa exata de péptido, volume adicionado para preparar a solução-mãe);
- Caracterização da solução de controlo positivo (massa exata da substância de controlo positivo, volume adicionado para preparar a solução de ensaio);
- Caracterização das soluções do produto químico em estudo (massa exata do produto, volume adicionado para preparar a solução de ensaio).

Regulação do aparelho e análise por HPLC

- Tipo de aparelho de HPLC, de colunas e pré-colunas, de detetor e de sistema de amostragem automática;
- Parâmetros relevantes para a análise por HPLC, como a temperatura da coluna, os volumes injetados, o caudal e o gradiente.

Adequação do sistema

- Área do pico correspondente aos péptidos, a 220 nm, para cada padrão e controlo de referência A;
- Representação gráfica da curva de calibração linear e indicação do parâmetro r^2 ;
- Concentração de péptido em cada replicado do controlo de referência A;
- Concentração média de péptidos (mM) nos três controlos de referência A, com os respetivos desvio-padrão e coeficiente de variação;
- Concentração de péptidos nos controlos de referência A e C.

Sequência de análise

- No respeitante aos controlos de referência:
 - Área do pico correspondente aos péptidos, a 220 nm, para cada replicado B e C;
 - Área média do pico correspondente aos péptidos, a 220 nm, para os nove controlos de referência B e C em acetonitrilo, com os respetivos desvio-padrão e coeficiente de variação (indicação da estabilidade dos controlos de referência ao longo do tempo de análise);
 - Para cada solvente utilizado, a área média dos picos correspondentes aos péptidos, a 220 nm, para os três controlos de referência C adequados (para o cálculo da percentagem de consumo de péptidos);
 - Para cada solvente utilizado, a concentração de péptidos (mM) dos três controlos de referência C adequados;
 - Para cada solvente utilizado, a concentração média de péptidos (mM) dos três controlos de referência C adequados, com os respetivos desvio-padrão e coeficiente de variação;
- No respeitante ao controlo positivo:
 - Área do pico correspondente aos péptidos, a 220 nm, para cada replicado;
 - Percentagem de consumo de péptido em cada replicado;
 - Percentagem média de consumo de péptidos nos três replicados, com os respetivos desvio-padrão e coeficiente de variação.
- No respeitante a cada produto químico em estudo:
 - Aparência do precipitado na mistura reacional no final do período de incubação, caso ocorra. Indicar se o precipitado foi ressolubilizado ou centrifugado;

- Ocorrência de coeluição;
- Descrição de quaisquer outras observações relevantes;
- Área do pico correspondente aos péptidos, a 220 nm, para cada replicado;
- Percentagem de consumo de péptido em cada replicado;
- Percentagem média de consumo de péptidos nos três replicados, com os respetivos desvio-padrão e coeficiente de variação;
- Percentagem média de consumo de cisteína e lisina;
- Modelo de previsão utilizado e previsão DPRA.

Avaliação da competência

- Se pertinente, procedimento utilizado a fim de demonstrar a competência do laboratório para a execução do método de ensaio (p. ex., ensaio de substâncias de referência) ou a reprodutibilidade do desempenho do método de ensaio ao longo do tempo.

Discussão dos resultados

- Discussão dos resultados obtidos com o método de ensaio DPRA;
- Discussão dos resultados do método de ensaio no âmbito de IATA, caso existam outras informações relevantes.

Conclusões

REFERÊNCIAS

- 1) Nações Unidas (ONU) (2013). Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (GHS). 5.ª edição revista, ONU Nova Iorque e Genebra, 2013. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- 2) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Parte 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.
- 3) Capítulo B.6 do presente anexo: Sensibilização cutânea
- 4) Capítulo B.42 do presente anexo: Ensaio de gânglios linfáticos locais
- 5) Capítulo B.50 do presente anexo: Sensibilização cutânea: Ensaio de gânglios linfáticos locais: DA.
- 6) Capítulo B.51 do presente anexo: Sensibilização cutânea: Ensaio de gânglios linfáticos locais BrdU-ELISA
- 7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.
- 8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.
- 9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.
- 10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Disponível em: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra>
- 11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, publicado em linha, 14 de maio de 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

- 12) Bauch *et al.* (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63: 489-504.
 - 13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicology in vitro* 27:609-618.
 - 14) Ball *et al.* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 60:389-400.
 - 15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine* 64:625-639.
 - 16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.
 - 17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.
 - 18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Disponível no seguinte endereço: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra
 - 19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, publicado em linha, 9 de abril de 2013, DOI:10.1002/jat.2868.
 - 20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Disponível no seguinte endereço: <http://ecvam-dbalml.jrc.ec.europa.eu/>
 - 21) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
 - 22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Disponível no seguinte endereço: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf — 138
 - 23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
-

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida da eficiência do método e um dos aspetos da «adequação». Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos do método de ensaio (21).

DOP (via determinante dos efeitos adversos): Sequência de eventos na estrutura de um produto químico em estudo ou grupo de produtos químicos afins, após o evento molecular iniciador, cujo resultado tenha consequências *in vivo* (2).

Curva de calibração: Relação entre a resposta experimental e a concentração analítica de uma determinada substância (também denominada *curva-padrão*).

Produto químico: Substância ou mistura.

Coefficiente de variação: Medida da variabilidade calculada para um grupo de dados relativos a replicados, que se obtém dividindo o desvio-padrão pela média. Pode multiplicar-se por 100 para ser expresso em percentagem.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente ou de uma situação, suscetível de causar efeitos adversos num organismo, sistema ou (sub)população que lhe seja exposto.

IATA (abordagem integrada de ensaio e avaliação): Abordagem estruturada para identificação (potencial) e caracterização (extensão) do perigo e/ou para avaliação da segurança (potencial/extensão e exposição) de um produto químico ou grupo de produtos químicos, que integra e pondera, de forma estratégica, todos os dados pertinentes, com o objetivo de fundamentar uma decisão regulamentar sobre o perigo e/ou risco potencial e/ou a necessidade de realizar ensaios complementares.

Evento molecular iniciador: Perturbação de um sistema biológico, a nível molecular, induzida por produtos químicos, identificada como o evento iniciador de uma via determinante dos efeitos adversos.

Mistura: Mistura ou solução constituída por duas ou mais substâncias que nela não reagem (1).

Substância monocomponente: Substância, definida pela sua composição quantitativa, na qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração ≥ 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes é que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

Amostra de controlo positiva: Replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e tratado com uma substância que comprovadamente induz reação positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade da reação positiva a esta amostra de controlo ao longo do tempo, essa reação não deve ser excessivamente positiva.

Controlo de referência: Amostra não tratada que contém todos os componentes do sistema de ensaio, incluindo o solvente ou veículo, e é ensaiada, juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para estabelecer a linha de base de reação para as amostras tratadas com o produto químico em estudo, dissolvido no mesmo solvente ou veículo. Quando ensaiada com uma amostra de controlo negativa correspondente, aquela amostra também permite determinar se o solvente ou veículo interage com o sistema de ensaio.

Adequação: Relação do ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (21).

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial, bem como da repetibilidade intralaboratorial (21).

Reprodutibilidade: Acordo entre resultados obtidos em ensaios com o mesmo produto químico, utilizando o mesmo protocolo (ver «Fiabilidade») (21).

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo método de ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (21).

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo método de ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (21).

Substância: Um elemento químico e os seus compostos no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo aditivos necessários para preservar a estabilidade do produto e impurezas derivadas do processo utilizado, mas excluindo solventes que possam ser separados sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição (1).

Adequação do sistema: Determinação do desempenho (p. ex., sensibilidade) dos instrumentos por análise com um padrão de referência, antes da realização de um lote de análises (22).

Produto químico em estudo: Utiliza-se o termo «produto químico em estudo» para designar o produto químico que é objeto do ensaio.

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (em inglês: *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* — UN GHS): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência, etc.) e do ambiente (1).

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

Método de ensaio válido: Método de ensaio cuja importância e fiabilidade são consideradas suficientes para um objetivo específico e que se baseia em princípios cientificamente sólidos. Um método de ensaio nunca é válido em sentido absoluto, mas apenas em relação a um determinado objetivo (21).

Apêndice 2

SUBSTÂNCIAS PARA A DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

Sensibilização cutânea *in chemico*: Ensaio de reatividade direta de péptidos

Antes de utilizarem de forma rotineira o presente método de ensaio, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica mediante a obtenção dos resultados DPRA previstos para as dez substâncias recomendadas no quadro 1, bem como valores de consumo de cisteína e lisina incluídos na respetiva gama de referência, no respeitante a oito das dez substâncias de referência, para cada péptido. Estas substâncias foram selecionadas de modo a representarem a gama de reações aos riscos de sensibilização da pele. Entre os outros critérios de seleção, contam-se a disponibilidade comercial, a existência de dados de referência *in vivo* de elevada qualidade e de dados *in vitro* obtidos pelo DPRA também de elevada qualidade, e ainda a utilização das substâncias no estudo de validação coordenado pelo EURL ECVAM para demonstrar o êxito da aplicação do método de ensaio nos laboratórios participantes no estudo.

Quadro 1

Substâncias recomendadas para a demonstração de competência técnica com o ensaio de reatividade direta de péptidos

Substâncias para a demonstração de competência	N.º CAS	Estado físico	Previsão <i>in vivo</i> ⁽¹⁾	Previsão DPRA ⁽²⁾	Gama ⁽³⁾ de percentagens de consumo de péptido de cisteína	Gama ⁽³⁾ de percentagens de consumo de péptido de lisina
2,4-Dinitrocloro-benzeno	97-00-7	Sólido	Sensibilizante (extremo)	Positiva	90-100	15-45
Oxazolona	15646-46-5	Sólido	Sensibilizante (extremo)	Positiva	60-80	10-55
Formaldeído	50-00-0	Líquido	Sensibilizante (forte)	Positiva	30-60	0-24
Benzilidenoacetona	122-57-6	Sólido	Sensibilizante (moderado)	Positiva	80-100	0-7
Farnesal	19317-11-4	Líquido	Sensibilizante (fraco)	Positiva	15-55	0-25
2,3-Butanodiona	431-03-8	Líquido	Sensibilizante (fraco)	Positiva	60-100	10-45
1-Butanol	71-36-3	Líquido	Não sensibilizante	Negativa	0-7	0-5,5
6-Metilcumarina	92-48-8	Sólido	Não sensibilizante	Negativa	0-7	0-5,5

Substâncias para a demonstração de competência	N.º CAS	Estado físico	Previsão <i>in vivo</i> ⁽¹⁾	Previsão DPRA ⁽²⁾	Gama ⁽³⁾ de percentagens de consumo de péptido de cisteína	Gama ⁽³⁾ de percentagens de consumo de péptido de lisina
Ácido láctico	50-21-5	Líquido	Não sensibilizante	Negativa	0-7	0-5,5
4-Metoxiacetofenona	100-06-1	Sólido	Não sensibilizante	Negativa	0-7	0-5,5

⁽¹⁾ As previsões de riscos e de potencial sensibilizante *in vivo* baseiam-se nos dados LLNA (19). O potencial sensibilizante *in vivo* é obtido por aplicação dos critérios propostos pelo ECETOC (23).

⁽²⁾ Deve ser ponderada uma previsão DPRA no âmbito de uma abordagem IATA, em conformidade com os pontos 9 e 11.

⁽³⁾ Gamas determinadas com base em, pelo menos, 10 valores de consumo produzidos por 6 laboratórios independentes.

Apêndice 3

EXEMPLOS DE SEQUÊNCIAS DE ANÁLISE

Padrões de calibração e controlos de referência	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Tampão de diluição Controlo de referência A, rep 1 Controlo de referência A, rep 2 Controlo de referência A, rep 3
Controlos de coeluição	Controlo de coeluição 1 para produto químico em estudo 1 Controlo de coeluição 2 para produto químico em estudo 2
Controlos de referência	Controlo de referência B, rep 1 Controlo de referência B, rep 2 Controlo de referência B, rep 3
Primeiro conjunto de replicados	Controlo de referência C, rep 1 Aldeído cinâmico, rep 1 Amostra 1, rep 1 Amostra 2, rep 1
Segundo conjunto de replicados	Controlo de referência C, rep 2 Aldeído cinâmico, rep 2 Amostra 1, rep 2 Amostra 2, rep 2
Terceiro conjunto de replicados	Controlo de referência C, rep 3 Aldeído cinâmico, rep 3 Amostra 1, rep 3 Amostra 2, rep 3
Controlos de referência	Controlo de referência B, rep 4 Controlo de referência B, rep 5 Controlo de referência B, rep 6

Devem incluir-se na sequência de análise três séries de controlos de referência (ou seja, amostras de controlo constituídas apenas pelo péptido dissolvido num solvente adequado):

Controlo de referência A: utilizado para verificar a adequação do sistema de HPLC.

Controlo de referência B: incluído no início e no final da sequência de análise, para verificar a estabilidade dos controlos de referência ao longo da análise.

Controlo de referência C: incluído na sequência de análise para verificar que o solvente utilizado para dissolver o produto químico em estudo não influencia a percentagem de consumo de péptidos.

B.60 Sensibilização cutânea *in vitro*: método de ensaio ARE-Nrf2 luciferase**INTRODUÇÃO**

O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline 442D* (2015) da OCDE. Um sensibilizante cutâneo é uma substância que provoca uma reação alérgica por contacto com a pele, conforme as definições do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS) (1) e do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas ⁽¹⁾ (CRE). O presente método de ensaio descreve um procedimento *in vitro* (ensaio ARE-Nrf2 luciferase) a utilizar para a distinção entre os sensibilizantes e os não-sensibilizantes cutâneos, em conformidade com o GHS da ONU (1) e o CRE.

Há consenso sobre os principais eventos biológicos subjacentes à sensibilização cutânea. Os conhecimentos atuais sobre os mecanismos químicos e biológicos associados a sensibilização cutânea foram sintetizados sob a forma de uma via determinante dos efeitos adversos (AOP — *Adverse Outcome Pathway*) (2), desde o evento molecular iniciador, passando pelos eventos intermédios, até ao efeito adverso na saúde, designadamente o surgimento de dermatites alérgicas de contacto nos seres humanos ou hipersensibilidade de contacto em roedores (2) (3). O evento molecular iniciador é constituído pela ligação covalente das substâncias eletrófilas aos centros nucleófilos das proteínas da pele. O segundo evento essencial nesta AOP tem lugar nos queratinócitos e inclui respostas inflamatórias, bem como a expressão de genes associados a vias de sinalização celular específicas, como as vias dependentes do elemento de resposta antioxidante/eletrófilo (ARE — *Antioxidant Response Element*). O terceiro evento essencial é a ativação das células dendríticas, normalmente avaliada com base na expressão de marcadores específicos da superfície celular (quimoquinas e citocinas). O quarto evento essencial consiste na proliferação de células T, que é avaliada indiretamente no ensaio de gânglios linfáticos locais com murídeos (4).

A determinação da sensibilização cutânea tem normalmente utilizado animais de laboratório. Os métodos clássicos que utilizam porquinhos-da-índia — ensaio de maximização de Magnusson Kligman com porquinhos-da-índia (GMPT) e ensaio de Buehler (TM B.6 (5)) — estudam as fases de indução e de desencadeamento da sensibilização cutânea. Um ensaio de gânglios linfáticos locais com murídeos (LLNA) (TM B. 42 (4)) e duas alterações deste sem recurso a isótopos radioativos — LLNA: DA (TM B.50 (5)) e LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (6)) –, que determinam exclusivamente a resposta indutiva, ganharam também aceitação, pois apresentam vantagens em relação aos ensaios com porquinhos-da-índia, quer em termos de bem-estar animal quer por proporcionarem uma medição objetiva da fase de indução da sensibilização cutânea.

Mais recentemente, para a avaliação do risco de sensibilização cutânea dos produtos químicos, consideraram-se cientificamente válidos métodos de ensaio *in chemico* e *in vitro* de abordagem determinista. Todavia, serão necessárias combinações de métodos de ensaio que não envolvam animais (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*), no âmbito de abordagens integradas de ensaio e avaliação (IATA — *Integrated Approaches to Testing and Assessment*), para substituir na íntegra os ensaios com animais utilizados atualmente, devido à abrangência determinista limitada da AOP, no que respeita aos métodos de ensaio atualmente disponíveis sem recurso a animais (2) (3).

O presente método (ensaio ARE-Nrf2 luciferase) tem por objetivo dar resposta ao segundo evento essencial explicado no ponto 2. Verificou-se que os sensibilizantes cutâneos induzem genes regulados pelo elemento de resposta antioxidante (ARE) (8) (9). As moléculas eletrófilas de pequenas dimensões, como os sensibilizantes cutâneos, podem agir sobre a proteína sensora Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*): p. ex., por alteração das ligações covalentes do resíduo de cisteína, resultando na sua dissociação relativamente ao fator de transcrição NCR 2 (*Nuclear factor-erythroid 2 fator 2*). O fator Nrf2 dissociado pode então ativar os genes dependentes do ARE, como os genes que codificam os enzimas desintoxicantes da fase II (8) (10) (11).

Atualmente, o único ensaio ARE-Nrf2 luciferase *in vitro* abrangido pelo presente método de ensaio é o ensaio KeratinoSens™, relativamente ao qual foram concluídos estudos de validação (9) (12) (13), seguidos de uma análise independente inter pares realizada pelo laboratório de referência da União Europeia para as alternativas à experimentação em animais (EURL ECVAM) (14). O ensaio KeratinoSens™ foi considerado cientificamente válido para utilização no âmbito de IATA, em apoio à distinção entre sensibilizantes e não-sensibilizantes cutâneos, para efeitos de classificação e rotulagem (14). Os laboratórios que desejem aplicar o método de ensaio podem obter a linha celular recombinante utilizada no ensaio KeratinoSens™ estabelecendo um acordo de licença com a entidade que desenvolveu o método (15).

⁽¹⁾ 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).

O apêndice 1 contém definições.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS, APLICABILIDADE E LIMITAÇÕES

Uma vez que a ativação da via Keap1-Nrf2-ARE incide apenas no segundo evento essencial da AOP de sensibilização cutânea, as informações provenientes de métodos de ensaio baseados na ativação desta via não serão provavelmente suficientes, por si só, para se concluir do potencial de sensibilização cutânea dos produtos químicos. Por conseguinte, os dados obtidos com o presente método de ensaio devem ser ponderados no contexto de abordagens integradas, como a IATA, e combinados com outras informações complementares, decorrentes, por exemplo, de ensaios *in vitro* respeitantes a outros eventos importantes da AOP de sensibilização cutânea, bem como métodos sem ensaios que incluem a interpolação com base em dados relativos a produtos químicos análogos. As referências (13) (16) (17) (18) (19) apresentam exemplos para a utilização do método de ensaio ARE-Nrf2 luciferase, juntamente com outras informações.

O presente método de ensaio pode ser utilizado para distinção entre os sensibilizantes cutâneos (categoria 1 do sistema GHS/CRE) e os não-sensibilizantes, no contexto da IATA. Não pode ser utilizado isoladamente, nem para classificar os sensibilizantes cutâneos nas subcategorias 1A e 1B do GHS, nem para estabelecer o potencial de sensibilização no contexto de avaliações de segurança. Todavia, consoante o quadro regulamentar, um resultado positivo pode ser utilizado, por si só, para classificar uma substância na categoria 1 do sistema GHS/CRE.

Com base no conjunto de dados do estudo de validação e dos ensaios internos utilizados para a avaliação independente interpares do método de ensaio, foi demonstrado que o ensaio KeratinoSens™ é aplicável em laboratórios com experiência em culturas celulares. O nível de reprodutibilidade esperado das previsões para o método de ensaio é da ordem de 85 %, tanto a nível intralaboratorial como interlaboratorial (14). A exatidão (77 % — 155/201), a sensibilidade (78 % — 71/91) e a especificidade (76 % — 84/110) do ensaio KeratinoSens™ para distinguir os sensibilizantes cutâneos (a saber, UN GHS/CLP Cat. 1) dos não-sensibilizantes, em comparação com os resultados LLNA, foram calculadas tendo em conta todos os dados apresentados ao EURL ECVAM para avaliação e análise interpares do método de ensaio (14). Estes valores são semelhantes aos recentemente publicados com base em ensaios internos de cerca de 145 substâncias (77 % de precisão, 79 % de sensibilidade, 72 % de especificidade) (13). O ensaio KeratinoSens™ é mais suscetível de subprever produtos químicos com potencial de sensibilização cutânea baixo a moderado (subcategoria 1B do GHS/CRE) do que produtos químicos com potencial elevado (subcategoria 1A do GHS/CRE) — (13) e (14). No seu conjunto, estas informações indicam a utilidade do ensaio KeratinoSens™ para identificar riscos de sensibilização cutânea. Contudo, os valores de precisão apresentados para o ensaio KeratinoSens™ utilizado de forma independente são meramente indicativos, dado que o método de ensaio deve ser tido em conta juntamente com outras fontes de informação no contexto de uma IATA, em conformidade com o disposto no ponto 9. Além disso, na avaliação de métodos de ensaio de sensibilização cutânea que não utilizem animais, deve ter-se em mente que o método LLNA e outros ensaios com animais podem não refletir de forma adequada a reação da espécie-alvo (a saber, a espécie humana).

O termo «produto químico em estudo» utilizado neste método de ensaio, refere-se ao produto que é objeto do ensaio e não à aplicabilidade do método ARE-Nrf2 luciferase ao ensaio de substâncias e/ou misturas. Com base nos dados atualmente disponíveis, considera-se o ensaio KeratinoSens™ aplicável a produtos químicos que abrangem uma grande variedade de grupos funcionais orgânicos, mecanismos de reação, potenciais de sensibilização cutânea (determinados com estudos *in vivo*) e propriedades físico-químicas (9) (12) (13) e (14). Testaram-se principalmente substâncias monocomponentes, embora haja dados relativos a ensaios de misturas (20). Considera-se, porém, que o método é tecnicamente aplicável ao ensaio de substâncias e misturas multicomponentes. Contudo, antes da aplicação do método a uma mistura para obter dados com fins regulamentares, importa ponderar se — e, em caso afirmativo, por que motivo — o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Tais considerações são dispensáveis se houver um requisito regulamentar para o ensaio da mistura. Acresce que, no caso de ensaios de substâncias multicomponentes ou misturas, deve ser tida em conta a possível interferência de componentes citotóxicos com as respostas observadas. O método de ensaio é aplicável a produtos químicos solúveis ou que formem uma dispersão estável (ou seja, um coloide ou uma suspensão em que o produto químico em estudo não precipite nem se separe do solvente em diferentes fases), quer em água quer em DMSO (aplicável a todos os componentes do produto químico em estudo, em caso de ensaio de uma substância multicomponentes ou de uma mistura). Os produtos químicos em estudo que não satisfaçam estas condições à concentração final mais elevada de

2 000 μM (ver ponto 22) podem ser ensaiados a concentrações mais baixas. Nesse caso, os resultados que satisfazem os critérios de positividade descritos no ponto 39 podem continuar a ser utilizados para apoiar a identificação do produto químico em estudo como sensibilizante cutâneo, enquanto um resultado negativo obtido com concentrações $< 1\,000\,\mu\text{M}$ deve ser considerado inconclusivo (ver modelo de previsão no ponto 39). Em geral, as substâncias com log P não superior a 5 são testadas com êxito, enquanto as substâncias extremamente hidrófobas (log P superior a 7) estão fora do âmbito de aplicabilidade reconhecido do método de ensaio (14). Para substâncias com log P compreendido entre 5 e 7, apenas se dispõe de informações limitadas.

Os resultados negativos devem ser interpretados com cuidado, uma vez que as substâncias que reagem exclusivamente com resíduos de lisina podem produzir esse tipo de resultados no ensaio. Por outro lado, devido à limitada capacidade metabólica da linha celular utilizada (21) e às condições experimentais, os pró-haptenos (produtos químicos que exigem ativação enzimática, através, por exemplo, de enzimas P450) e os pré-haptenos (produtos químicos ativados por auto-oxidação), em especial com uma velocidade de oxidação lenta, podem também produzir resultados negativos. Os produtos químicos em estudo que não atuam como sensibilizantes mas constituem, todavia, fatores de stress químico, podem produzir falsos resultados positivos (14). E nem sempre é possível avaliar devidamente os produtos químicos altamente citotóxicos. Por último, os produtos químicos que interferem com a enzima luciferase podem confundir a atividade desta em ensaios com células, causando inibição aparente ou um aumento de luminescência (22). Foi referida, por exemplo, a interferência de concentrações de fitoestrogénios superiores a $1\mu\text{M}$ com os sinais de luminescência em outros ensaios de genes repórteres da luciferase, devido à sobreativação do gene repórter (23). Deve, pois, examinar-se cuidadosamente a expressão da luciferase obtida com concentrações elevadas de fitoestrogénios ou de produtos químicos similares suspeitos de produzirem o mesmo tipo de sobreativação do gene repórter da luciferase (23). Se houver provas de que não é aplicável a outras categorias específicas de produtos químicos em estudo, o método de ensaio não deve ser utilizado para essas categorias.

Para além de apoiar a distinção entre sensibilizadores e não-sensibilizadores cutâneos, o ensaio KeratinoSens™, quando utilizado em abordagens integradas, como a IATA, proporciona também informações, em termos de concentração-resposta, suscetíveis de contribuir para a avaliação do potencial de sensibilização (19). São necessários, contudo, trabalhos complementares, de preferência com base em dados humanos fiáveis, para determinar a forma como os resultados do ensaio KeratinoSens™ podem contribuir para a avaliação do potencial de sensibilização (24) e para a subcategorização dos sensibilizantes em conformidade com o sistema GHS da ONU/CRE.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O método de ensaio ARE-Nrf2 luciferase utiliza uma linha imortalizada de células aderentes derivada de queratinócitos humanos transfetados de forma estável com um plasmídeo selecionável. A linhagem celular contém o gene da luciferase sob controlo transcricional de um promotor constitutivo fundido com um elemento ARE de um gene cuja regulação ascendente por sensibilizantes por contacto seja conhecida (25) (26). O sinal da luciferase reflete a ativação pelos sensibilizantes dos genes endógenos dependentes do Nrf2, tendo sido demonstrada a dependência do sinal da luciferase relativamente à linha celular recombinante do Nrf2 (27). É, assim, possível a medição quantitativa (detecção por luminescência) da indução do gene da luciferase por recurso a substratos de luciferase produtores de luz bem estabelecidos, indicadores da atividade do fator de transcrição do Nrf2 nas células, após exposição a substâncias eletrófilas.

Os produtos químicos em estudo são considerados positivos no ensaio KeratinoSens™ se induzirem de forma estatisticamente significativa a atividade da luciferase acima de um determinado limiar ($> 1,5$ vezes ou 50 %), abaixo de uma determinada concentração que não afete de forma significativa a viabilidade celular (abaixo de $1\,000\,\mu\text{M}$ e a uma concentração à qual a viabilidade celular é superior a 70 %) (9) (12). Para o efeito, determina-se o fator máximo de indução da atividade da luciferase relativamente ao controlo (negativo) com solvente (I_{max}). Além disso, uma vez que as células são expostas a uma série de concentrações dos produtos químicos em estudo, a concentração necessária a uma indução da atividade da luciferase estatisticamente significativa superior ao limiar (valor $\text{EC}_{1,5}$) deve ser estimada por interpolação a partir da curva dose-resposta (ver ponto 32 no respeitante aos cálculos). Por último, devem realizar-se, em paralelo, medições de citotoxicidade, para avaliar se os níveis de indução da atividade da luciferase se observam a concentrações subcitotóxicas.

Antes de passarem a utilizar, por rotina, o ensaio ARE-Nrf2 luciferase de acordo com a presente descrição, os laboratórios terão de demonstrar a sua competência técnica, utilizando para o efeito as dez substâncias de referência indicadas no apêndice 2.

Há normas de desempenho (28) destinadas a facilitar a validação de métodos de ensaio ARE-Nrf2 luciferase *in vitro*, novos ou modificados, similares ao ensaio KeratinoSens™ e a permitir a alteração oportuna do presente método de ensaio para a sua inclusão. A aceitação mútua de dados nos termos do acordo da OCDE só poderá ser garantida no caso de métodos de ensaio validados de acordo com as normas de desempenho, se estes métodos tiverem sido revistos e incluídos na correspondente diretriz de ensaio da OCDE.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Atualmente, o único método abrangido pelo presente método de ensaio é o ensaio KeratinoSens™ validado cientificamente (9) (12) (13) (14). Os procedimentos operacionais normalizados (PON) para o ensaio KeratinoSens™ estão disponíveis e devem ser utilizados nas fases de implementação e utilização do método de ensaio no laboratório (15). Os laboratórios que desejem aplicar o método de ensaio podem obter a linha celular recombinante utilizada no ensaio KeratinoSens™ mediante o estabelecimento de um acordo de licença com a entidade que desenvolveu o método. Os pontos que se seguem apresentam uma descrição dos principais componentes e procedimentos do método de ensaio luciferase ARE-Nrf2.

Preparação das culturas de queratinócitos

Deve utilizar-se uma linha celular transgénica com uma inserção estável do gene repórter da luciferase sob o controlo do elemento ARE (p. ex., a linha celular KeratinoSens™). Após a receção, as células são propagadas (p. ex., 2 a 4 passagens) e armazenadas congeladas sob a forma de aglomerado homogéneo. As células provenientes deste aglomerado original podem ser propagadas até um determinado número máximo de passagens (25, no caso do ensaio KeratinoSens™) e são utilizadas para ensaios de rotina, utilizando o meio de manutenção adequado (no caso do ensaio KeratinoSens™, DMEM com soro e Geneticin).

As células utilizadas no ensaio devem ser confluentes a 80-90 %, devendo ter-se o cuidado de garantir que nunca são cultivadas até à confluência total. Na véspera do ensaio, as células são colhidas e distribuídas em placas de 96 poços (10 000 células por poço, no caso do ensaio KeratinoSens™). Deve prestar-se atenção para evitar a sedimentação das células durante a inoculação, com vista a assegurar uma distribuição homogénea do número de células em cada poço — caso contrário, esta etapa pode originar uma grande variabilidade entre poços. Em cada réplica, utilizam-se três replicados para as medições de atividade da luciferase, utilizando um replicado paralelo para o ensaio de viabilidade celular.

Preparação do produto químico em estudo e das substâncias de controlo

O produto químico em estudo e as substâncias de controlo são preparados no dia do ensaio. No ensaio KeratinoSens™, os produtos químicos em estudo são dissolvidos em dimetilssulfóxido (DMSO) até se obter a concentração final pretendida (p. ex., 200 mM). As soluções de DMSO podem ser consideradas autoesterilizantes, pelo que não é necessário esterilizá-las por filtração. Os produtos químicos insolúveis em DMSO são dissolvidos em água esterilizada ou em meio de cultura e as soluções são esterilizadas, nomeadamente por filtração. No caso de produtos químicos que não tenham massa molecular definida, prepara-se uma solução-mãe com concentração por defeito — 40 mg/ml ou 4 % (m/v) — para o ensaio KeratinoSens™. Se se utilizarem solventes diversos do DMSO, da água ou de meio de cultura, deve apresentar-se uma fundamentação científica suficiente.

A partir das soluções-mãe do produto químico em DMSO, efetua-se uma série de diluições com DMSO de forma a obter 12 concentrações de referência do produto (de 0,098 e 200 mM, no ensaio KeratinoSens™), para análise subsequente. No caso de produtos químicos não solúveis em DMSO, as diluições para a obtenção das concentrações de referência são feitas por recurso a água esterilizada ou meio de cultura estéril. Independentemente do solvente utilizado, as concentrações de referência são, por sua vez, diluídas 25 vezes em meio de cultura com soro e finalmente utilizadas para tratamento com um fator de diluição de 4, de modo a que as concentrações finais do produto químico em estudo se situem na gama de 0,98 a 2 000 µM, no ensaio KeratinoSens™. Podem utilizar-se concentrações alternativas, com justificação adequada (p. ex., em caso de citotoxicidade ou de baixa solubilidade).

O controlo negativo (solvente) utilizado no ensaio KeratinoSens™ é o DMSO (n.º CAS 67-68-5, pureza ≥ 99 %), para o qual se preparam seis poços por placa. É objeto das mesmas operações de diluição descritas no ponto 22 para as concentrações de referência, de forma a que a concentração final do controlo negativo (solvente) seja de 1 %, valor que se sabe não afetar a viabilidade celular e que corresponde à concentração de DMSO nos lotes com o produto químico em estudo e no controlo positivo. No caso de produtos químicos não solúveis em DMSO, cujas diluições são efetuadas em água, a concentração de DMSO em todos os poços da solução de ensaio final deve ser ajustada para 1 %, tal como para os restantes produtos químicos em estudo e substâncias de controlo.

O controlo positivo utilizado no ensaio KeratinoSens™ é o aldeído cinâmico (n.º CAS 14371-10-9, pureza ≥ 98 %), do qual se prepara uma série de 5 concentrações de referência na gama de 0,4 a 6,4 mM em DMSO (a partir de uma solução-mãe a 6,4 mM), diluídas do modo descrito para as concentrações de referência no ponto 22, de forma a que a concentração final do controlo positivo se situe na gama de 4 a 64 µM. Podem utilizar-se outros controlos positivos adequados, que apresentem, de preferência, valores $EC_{1,5}$ na zona intermédia da gama, caso haja dados históricos que permitam pressupor critérios de aceitabilidade comparáveis.

Aplicação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

No respeitante a cada produto químico em estudo e a cada substância de controlo positivo, é necessário um ensaio para obter uma estimativa (positiva ou negativa); esse ensaio utiliza, pelo menos, duas réplicas independentes, cada uma delas constituída por três replicados (ou seja, $n = 6$). Em caso de resultados discordantes entre as duas réplicas independentes, deve realizar-se uma terceira réplica com três replicados (ou seja, $n = 9$). Cada réplica independente é realizada num dia diferente, com uma solução-mãe fresca dos produtos químicos em estudo e células colhidas especificamente. As células podem, contudo, provir da mesma passagem.

Após a inoculação do modo descrito no ponto 20, as células são cultivadas durante 24 horas em placas de microtitulação de 96 poços. O meio é então retirado e substituído por meio de cultura fresco (150 µl de meio de cultura com soro mas sem Geneticin, no caso do ensaio KeratinoSens™), ao qual se adicionam 50 µl do produto químico em estudo e das substâncias de controlo, diluídos 25 vezes. Pelo menos um poço por placa deve ficar vazio (sem células e sem tratamento), para a avaliação das concentrações de fundo.

As placas são, em seguida, incubadas durante 48 horas a 37 ± 1 °C, numa atmosfera com 5 % de CO₂, no ensaio KeratinoSens™. Deve ter-se o cuidado de evitar a evaporação de produtos químicos voláteis, bem como a contaminação cruzada entre poços pelos produtos químicos em estudo (por exemplo, cobrindo as placas com películas antes da incubação com os produtos).

Medições da atividade da luciferase

Três fatores são essenciais para garantir leituras adequadas da luminescência:

- escolha de um luminómetro sensível,
- utilização de placas com altura suficiente para evitar a contaminação cruzada pela luz; e
- utilização de um substrato de luciferase com luminosidade adequada, para garantir sensibilidade suficiente e baixa variabilidade.

Antes do ensaio, importa realizar um ensaio de controlo do modo descrito no apêndice 3, para garantir que são satisfeitas as três condições.

Após as 48 horas de exposição do produto químico em estudo e das substâncias de referência no ensaio KeratinoSens™, as células são lavadas com um tampão salino de fosfatos, adicionando-se a cada poço, durante 20 minutos, à temperatura ambiente, o tampão de lise adequado para as leituras de luminescência.

As placas com os lisados de células são então colocadas no luminómetro para leitura. No ensaio KeratinoSens™, a programação é a seguinte: i) adiciona-se o substrato de luciferase a cada poço (50 µl); ii) espera-se 1 segundo; iii) integra-se a atividade da luciferase durante 2 segundos. Devem justificar-se quaisquer condições alternativas a que eventualmente se recorra (p. ex., em função do modelo de luminómetro utilizado). Pode também utilizar-se um substrato luminescente que satisfaça os requisitos de controlo de qualidade descritos no apêndice 3.

Avaliação da citotoxicidade

No ensaio de viabilidade celular KeratinoSens™, o meio é substituído, após as 48 horas de exposição, por um meio fresco que contém MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio; n.º CAS 298-93-1] e células incubadas durante 4 horas a 37 °C, numa atmosfera com 5 % de CO₂. O meio com MTT é seguidamente retirado e as células são lisadas de um dia para o outro (p. ex., adicionando a cada alvéolo uma solução de SDS a 10 %). Após agitação, mede-se a absorção a 600 nm com um fotómetro.

RESULTADOS E RELATÓRIO

Avaliação dos resultados

No ensaio KeratinoSens™, calculam-se os seguintes parâmetros:

- valor máximo médio de indução da atividade da luciferase ($I_{\max}$) observada para cada concentração do produto químico em estudo e do controlo positivo;
- valor de $EC_{1,5}$, que representa a concentração à qual a indução de atividade da luciferase é superior ao limiar de 1,5 vezes (isto é, aumento de 50 % da atividade da luciferase); e
- as concentrações IC_{50} e IC_{30} correspondentes a uma redução da viabilidade celular de 50 % e 30 %, respetivamente.
- A equação 1 permite calcular o fator de indução de atividade da luciferase; o fator máximo de indução ($I_{\max}$) é calculado sob a forma de média das réplicas individuais.

Equação 1:

$$\text{Fator de indução} = \frac{(L_{\text{amostra}} - L_{\text{branco}})}{(L_{\text{solvente}} - L_{\text{branco}})}$$

em que:

- L_{amostra} representa a leitura da luminescência no poço do produto químico em estudo (amostra)
- L_{branco} representa a leitura da luminescência no poço que não contém células nem o produto (branco)
- L_{solvente} representa a média das leituras da luminescência no poço que contém as células e o controlo negativo (solvente)

O valor $EC_{1,5}$ é calculado por interpolação linear de acordo com a equação 2, sendo o valor $EC_{1,5}$ global calculado como média geométrica das réplicas individuais.

Equação 2:

$$EC_{1,5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1,5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

em que:

C_a representa a concentração mais baixa, em μM , com indução $> 1,5$ vezes

C_b representa a concentração mais elevada, em μM , com indução $< 1,5$ vezes

I_a representa o fator de indução determinado à concentração mais baixa, com indução $> 1,5$ vezes (média dos três poços de replicados)

I_b representa o fator de indução determinado à concentração mais elevada com indução $< 1,5$ vezes (média dos três poços de replicados)

A viabilidade é calculada pela equação 3:

Equação 3:

$$\text{Viabilidade} = \frac{(V_{\text{amostra}} - V_{\text{branco}})}{V_{\text{solvente}} - V_{\text{branco}}} \times 100$$

em que:

V_{amostra} representa a leitura da absorvância do MTT no poço do produto químico em estudo (amostra)

V_{branco} representa a leitura da absorvância do MTT no poço que não contém células nem o produto (em branco)

V_{solvente} representa a média das leituras da absorvância do MTT nos poços que contêm as células e o controlo negativo (solvente)

Os valores EC_{50} e IC_{30} são calculados por interpolação linear de acordo com a equação 4, sendo os valores EC_{50} e IC_{30} globais calculados como médias geométricas das réplicas individuais.

Equação 4:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

em que:

X representa a redução percentual da concentração a determinar (50 e 30 para IC_{50} e IC_{30} , respetivamente)

C_a representa a concentração mais baixa, em μM , com redução da viabilidade $> x \%$

C_b representa a concentração mais elevada, em μM , com redução da viabilidade $< x \%$

V_a representa a percentagem de viabilidade à concentração mais baixa, com redução da viabilidade $> x \%$

V_b representa a percentagem de viabilidade à concentração mais elevada, com redução da viabilidade $< x \%$

Para cada concentração com uma indução da atividade da luciferase superior a 1,5 vezes, calcula-se a significância estatística (p. ex., por um teste t-Student bilateral) comparando os valores de luminescência das três amostras de replicados com os valores de luminescência nos poços de controlo negativo (solvente), com vista a determinar se a indução de atividade da luciferase é estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A concentração mais baixa com indução de atividade da luciferase $> 1,5$ vezes é determinante do valor de $EC_{1,5}$. Em cada caso, verifica-se se este valor é inferior a IC_{30} , o que indica uma redução da viabilidade celular inferior à concentração que determina a $EC_{1,5}$.

Recomenda-se que os dados sejam verificados visualmente com o auxílio de gráficos. Caso não se observe uma curva dose-resposta bem definida ou se a curva dose-resposta for bifásica (isto é, ultrapassar duas vezes o limiar de 1,5), a experiência deve ser repetida para verificar se este comportamento é específico do produto químico em estudo ou devido a uma anomalia experimental. Se a resposta bifásica for reproduzível numa experiência independente, deve comunicar-se o valor mais baixo de $EC_{1,5}$ (concentração à qual o limiar de 1,5 é atingido pela primeira vez).

Nos raros casos em que se observe uma indução estatisticamente não significativa superior a 1,5 vezes, seguida de concentração mais elevada com uma indução estatisticamente significativa, os resultados desta última apenas são considerados válidos e positivos se a indução estatisticamente significativa acima do limiar de 1,5 tiver sido obtida para uma concentração não citotóxica.

Por último, no ensaio de produtos químicos em estudo que produzam uma indução igual ou superior a 1,5 vezes à concentração de ensaio mais baixa (0,98 μM), o valor de $EC_{1,5} < 0,98$ é estabelecido com base na inspeção visual da curva dose-resposta.

Critérios de aceitação

Ao utilizar o ensaio KeratinoSens™, importa cumprir os critérios de aceitação que se seguem. Em primeiro lugar, a indução da atividade da luciferase obtida com o controlo positivo (aldeído cinâmico) deve ser estatisticamente significativa acima do limiar de 1,5 (p. ex., recorrendo a um teste t) em, pelo menos, uma das concentrações de ensaio (de 4 a 64 μM).

Em segundo lugar, o valor de $EC_{1,5}$ deve situar-se no intervalo de dois desvios-padrão da média histórica do laboratório de ensaio (p. ex., entre 7 μM e 30 μM , de acordo com o conjunto de dados de validação), a atualizar regularmente. Além disso, a indução média nos três replicados de aldeído cinâmico a 64 μM deve situar-se entre 2 e 8. Se este critério não for preenchido, a relação dose-resposta do aldeído cinâmico deve ser cuidadosamente verificada, podendo os ensaios ser aceites apenas se existir uma relação clara dose-resposta com um aumento de indução da atividade da luciferase em função das concentrações, no controlo positivo.

Por último, o coeficiente de variação médio da leitura de luminescência para o controlo negativo (solvente) — DMSO — deve ser inferior a 20 % em cada réplica, constituída por 6 poços testados em triplicado. Se a variabilidade for mais elevada, há que descartar os resultados.

Interpretação dos resultados e modelo de previsão

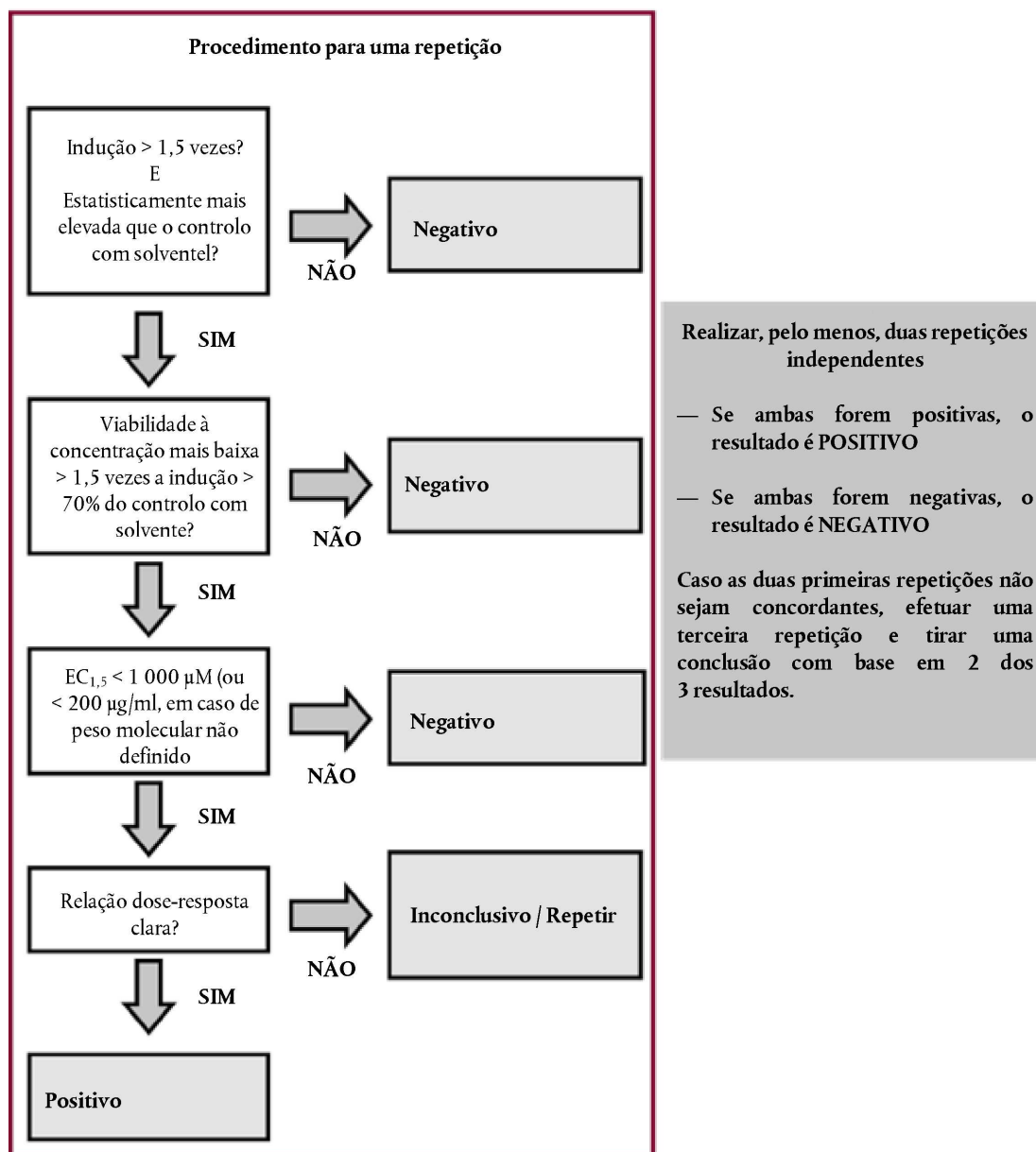
No ensaio KeratinoSens™, considera-se positiva uma previsão se forem satisfeitas as quatro condições que se seguem em 2 réplicas de 2 ou de 3; caso contrário, a previsão é considerada negativa (figura 1):

1. I_{max} superior a 1,5 vezes e significativamente diferente, do ponto de vista estatístico, do controlo negativo (solvente), de acordo com um teste t-Student bilateral não emparelhado;
2. Viabilidade celular superior a 70 % à concentração mais baixa com indução de atividade da luciferase superior a 1,5 vezes (ou seja, à concentração determinante da $EC_{1,5}$);
3. $EC_{1,5}$ inferior a 1 000 μM (ou inferior a 200 $\mu\text{g/ml}$, no caso de produtos químicos em estudo sem massa molecular definida);
4. Observa-se, de modo geral, uma relação dose-resposta aparente para a indução da luciferase (ou uma resposta bifásica, como referido no ponto 33).

Se, numa determinada réplica, as três primeiras condições se encontrarem preenchidas mas não se observar uma relação clara dose-resposta para a indução da luciferase, o resultado dessa réplica deve ser considerado inconclusivo, podendo ser necessário realizar outros ensaios (figura 1). Deve também ser considerado inconclusivo um resultado negativo obtido com concentrações < 1 000 μM (ou < 200 $\mu\text{g/ml}$ no caso de produtos químicos em estudo sem massa molecular definida) (ver ponto 11).

Figura 1

Modelo de previsão utilizado no ensaio KeratinoSens™. Uma previsão KeratinoSens™ deve ser ponderada no âmbito de uma abordagem IATA, em conformidade com os pontos 9 e 11.



Em certos casos raros, os produtos químicos em estudo que induzem a atividade da luciferase a níveis muito próximos dos níveis citotóxicos podem, em algumas réplicas, revelar-se positivos a níveis não citotóxicos (ou seja, $EC_{1,5}$, que determina a concentração inferior a IC_{30}) e, em outras réplicas, apenas a níveis citotóxicos (ou seja, $EC_{1,5}$, que determina a concentração superior a IC_{30}). Esses produtos químicos devem ser sujeitos a novo ensaio, com uma análise dose-resposta mais estrita, utilizando um fator de diluição inferior [p. ex., um fator de diluição entre poços de 1,33 ou 02 (= 1,41) vezes], para averiguar a eventual ocorrência de indução a níveis citotóxicos (9).

Relatório de ensaio

Elementos a incluir no relatório de ensaio:

Produto químico em estudo

— Substância monocomponente

— Dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros elementos;

- Aspeto físico, solubilidade em água e em DMSO, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se conhecidas;
 - Grau de pureza, identidade química das impurezas (conforme adequado e exequível), etc.;
 - Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
 - Concentração(ões) ensaiada(s);
 - Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.
- Substância multicomponentes, UVCB e mistura:
- Caracterização, tanto quanto possível — por exemplo, por identidade química (ver *supra*), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver *supra*) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;
 - Aspeto físico, solubilidade em água e em DMSO e outras propriedades físico-químicas relevantes, na medida em que estejam disponíveis;
 - Massa molecular ou, no caso de misturas/polímeros de composições conhecidas, massa molecular aparente, ou outras informações relevantes para a realização do estudo;
 - Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
 - Concentração(ões) ensaiada(s);
 - Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.

Grupos de controlo

- Controlo positivo
- Dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros elementos de identificação;
 - Aspeto físico, solubilidade em água e em DMSO, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se conhecidas e se pertinente;
 - Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
 - Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
 - Concentração(ões) ensaiada(s);
 - Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
 - Referência ao historial dos resultados dos controlos positivos que demonstrem o cumprimento dos critérios de aceitação, se aplicável.
- Controlo negativo (veículo)
- Dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS e/ou outros elementos;
 - Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;
 - Aspeto físico, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, caso sejam utilizados controlos negativos/veículos diversos dos referidos no método de ensaio, na medida em que essas informações sejam conhecidas;
 - Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;
 - Justificação da escolha do solvente, para cada produto químico em estudo.

Condições de realização do ensaio

- Nome e endereço do patrocinador, do laboratório e do diretor do estudo;
- Descrição do método de ensaio utilizado;
- Linha celular utilizada, suas condições de armazenamento e fonte (p. ex., laboratório a partir do qual foi obtida);
- Número de passagens e nível de confluência das células utilizadas no ensaio;
- Método de contagem celular utilizado para a inoculação antes do ensaio e medidas tomadas para assegurar a homogeneidade da distribuição do número de células (ver ponto 20);
- Luminómetro utilizado (p. ex., modelo), incluindo regulações do instrumento, substrato de luciferase utilizado e demonstração de medições de luminescência adequadas com base no ensaio de controlo descrito no apêndice 3;
- Procedimento utilizado a fim de demonstrar a competência do laboratório para executar o método de ensaio (p. ex., ensaio de substâncias de referência) ou a reprodutibilidade do desempenho do método de ensaio ao longo do tempo.

Procedimento de ensaio

- Número de réplicas e replicados utilizados;
- Concentrações do produto químico em estudo, processo de aplicação e tempo de exposição utilizado, se diferente do recomendado;
- Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;
- Descrição dos critérios de aceitação do estudo utilizados;
- Descrição de eventuais modificações na execução do ensaio.

Resultados

- Tabulação dos valores de $I_{\max}$, $EC_{1.5}$ e viabilidade celular (IC_{50} , IC_{30}) obtidos para o produto químico em estudo e para o controlo positivo, em cada réplica, bem como dos valores médios ($I_{\max}$: média; valores de $EC_{1.5}$ e de viabilidade: média geométrica) e desvio-padrão calculado a partir dos dados de todas as réplicas individuais; notação do produto químico em estudo de acordo com o modelo preditivo;
- Coeficiente de variação obtido para os valores de luminescência para o controlo negativo em cada experiência;
- Gráfico dose-resposta para a indução de atividade da luciferase e viabilidade celular;
- Descrição de quaisquer outras observações relevantes.

Discussão dos resultados

- Discussão dos resultados obtidos com o ensaio KeratinoSens™;
- Ponderação dos resultados do método de ensaio no âmbito de IATA, caso existam outras informações relevantes.

Conclusões

REFERÊNCIAS

- 1) Nações Unidas (ONU) (2013). Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS), 5.^a edição revista, ONU Nova Iorque e Genebra, 2013. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- 2) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Parte 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

- 3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology* 85, 367-485.
- 4) Capítulo B.42 do presente anexo: *Sensibilização cutânea: ensaio de gânglios linfáticos locais*.
- 5) Capítulo B.6 do presente anexo: *Sensibilização cutânea*.
- 6) Capítulo B.50 do presente anexo: *Sensibilização cutânea: ensaio de gânglios linfáticos locais: DA*.
- 7) Capítulo B.51 do presente anexo: *Sensibilização cutânea: ensaio de gânglios linfáticos locais: BrdU-ELISA*.
- 8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences* 113, 284-292.
- 9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281-290.
- 10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1779-1791.
- 11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1(1), 45-49.
- 12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
- 13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 1337-1352.
- 14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Disponível no seguinte endereço: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.
- 15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 pp. Disponível no seguinte endereço: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>
- 16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol. Sci.* 107, 106-121.
- 17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 60, 389-400.
- 18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 489-504.

- 19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J Appl Toxicol.* 33, 1353-1364.
 - 20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. *Toxicology In Vitro* 27, 1220-1225.
 - 21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1969.
 - 22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology* 17, 646-657.
 - 23) OCDE (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.
 - 24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
 - 25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J. Invest. Dermatol.*, 126, 1813-1822.
 - 26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301-316.
 - 27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol. in vitro* 27, 2225-2232.
 - 28) OCDE (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OECD, Paris.
 - 29) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.
 - 30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides — (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. <http://www.epa.gov/oppead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf>
-

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida da eficiência do método e um dos aspetos da «adequação». Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos do método de ensaio (29).

AOP (*Adverse Outcome Pathway* — via determinante dos efeitos adversos): Sequência de eventos na estrutura de um produto químico em estudo ou de um grupo de produtos químicos afins, após o evento molecular iniciador, cujo resultado tenha consequências *in vivo* (2).

ARE (*Antioxidant response element*): O elemento de resposta antioxidante (também denominado EpRE — elemento de resposta eletrófila) é um elemento de resposta situado na região promotora a montante de muitos genes citoprotectores e genes da fase II. Quando ativado pelo NFR 2, rege a indução transcricional desses genes.

Produto químico: Substância ou mistura.

Coefficiente de variação: Medida da variabilidade calculada para um grupo de dados relativos a replicados, que se obtém dividindo o desvio-padrão pela média. Pode multiplicar-se por 100 para ser expresso em percentagem.

EC_{1,5}: Valor interpolado para a concentração que induz 1,5 vezes a atividade da luciferase.

IC₃₀: Concentração que reduz a viabilidade celular em 30 %.

IC₅₀: Concentração que reduz a viabilidade celular em 50 %.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente ou de uma situação, suscetível de causar efeitos adversos num organismo, num sistema ou numa (sub)população que lhe sejam expostos.

IATA (*abordagem integrada de ensaio e avaliação*): Abordagem estruturada para a identificação (potencial) e caracterização (extensão) do perigo e/ou para a avaliação da segurança (potencial/extensão e exposição) de um produto químico ou grupo de produtos químicos, que integra e pondera, de forma estratégica, todos os dados pertinentes com o objetivo de fundamentar uma decisão regulamentar sobre o perigo e/ou risco potencial e/ou a necessidade de realizar ensaios complementares.

I_{max}: Fator de indução máxima da atividade da luciferase relativamente ao controlo negativo (solvente), para qualquer concentração do produto químico em estudo.

Keap1: Proteína sensora (*Kelch-like ech-associated Protein 1*) passível de regular a atividade do fator Nrf2. Em condições não induzidas, ativa o fator de transcrição Nrf2, promovendo assim a ubiquitinação e a degradação proteolítica no proteassoma. A modificação covalente dos resíduos de cisteína reativos da proteína Keap 1 por pequenas moléculas pode conduzir à dissociação do fator Nrf2 da proteína (8) (10) (11).

Mistura: Mistura ou solução constituída por duas ou mais substâncias que nela não reagem (1).

Substância monocomponente: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração ≥ 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes reside em que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

Nrf2 [(Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)]: Fator de transcrição envolvido no mecanismo da resposta antioxidante. Se não sofrer ubiquitinação, o fator Nrf2 desenvolve-se no citoplasma e desloca-se para o núcleo, onde se combina o ARE na região promotora a montante de muitos genes citoprotetores, iniciando a transcrição destes (8) (10) (11).

Amostra de controlo positiva: Replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com uma substância que comprovadamente induz reação positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade no tempo da reação a esta amostra de controlo, essa reação não deve ser excessivamente positiva.

Adequação: Relação do ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em apreciação. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (29).

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial, bem como da repetibilidade intralaboratorial (29).

Reprodutibilidade: Acordo entre resultados obtidos em ensaios com o mesmo produto químico, utilizando o mesmo protocolo (ver fiabilidade) (29).

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo método de ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (29).

Amostra de controlo do solvente/veículo: Replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio, com exceção do produto químico em estudo, mas incluindo o solvente. É utilizado para definir a base de referência das respostas no respeitante às amostras expostas ao produto químico em estudo dissolvido no mesmo solvente.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo método de ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (29).

Substância: Um elemento químico ou um composto de um elemento químico no estado natural ou obtido por qualquer processo de produção, incluindo os aditivos necessários para preservar a estabilidade do produto e as impurezas derivadas do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a composição desta (1).

Produto químico em estudo: O termo «produto químico em estudo» é utilizado para designar o produto químico que é objeto do ensaio.

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (em inglês: *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* — UN GHS): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos correspondentes elementos de comunicação, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa, com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência, etc.) e do ambiente (1).

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

Método de ensaio válido: Método de ensaio cujas importância e fiabilidade são consideradas suficientes para um objetivo específico e que se baseia em princípios cientificamente sólidos. Um método de ensaio nunca é válido em sentido absoluto, mas apenas em relação a um determinado objetivo (29).

Apêndice 2

SUBSTÂNCIAS PARA A DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

Sensibilização cutânea *in vitro*: método de ensaio ARE-Nrf2 luciferase

Antes de utilizarem de forma rotineira este método de ensaio, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica mediante a obtenção, pelo ensaio KeratinoSens™, dos resultados previstos para as dez substâncias recomendadas no quadro 1, bem como dos valores de EC_{1,5} e IC₅₀ incluídos na respetiva gama de referência, no respeitante a, pelo menos, oito das dez substâncias de referência. Estas substâncias foram selecionadas de modo a representarem a gama de reações aos riscos de sensibilização da pele. A disponibilidade comercial, a existência de referências *in vivo* de alta qualidade e a existência de dados *in vitro* de alta qualidade, obtidos com o ensaio KeratinoSens™, constituem outros critérios de seleção.

Quadro 1

Substâncias recomendadas para a demonstração de competência técnica com o ensaio KeratinoSens™

Substâncias para a demonstração de competência	N.º CAS	Fase	Previsão <i>in vivo</i> ⁽¹⁾	KeratinoSens™ Previsão ⁽²⁾	EC _{1,5} (µM) Gama de referência ⁽³⁾	IC ₅₀ (µM) Gama de referência ⁽³⁾
Isopropanol	67-63-0	Líquida	Não sensibilizante	Negativa	> 1 000	> 1 000
Ácido salicílico	69-72-7	Sólida	Não sensibilizante	Negativa	> 1 000	> 1 000
Ácido láctico	50-21-5	Líquida	Não sensibilizante	Negativa	> 1 000	> 1 000
Glicerol	56-81-5	Líquida	Não sensibilizante	Negativa	> 1 000	> 1 000
Álcool cinâmico	104-54-1	Sólida	Sensibilizante (fraco)	Positiva	25 – 175	> 1 000
Dimetacrilato de etilenoglicol	97-90-5	Líquida	Sensibilizante (fraco)	Positiva	5 – 125	> 500
2-Mercaptobenzo-tiazole	149-30-4	Sólida	Sensibilizante (moderado)	Positiva	25 – 250	> 500
Metildibromoglu-taronitrilo	35691-65-7	Sólida	Sensibilizante (forte)	Positiva	< 20	20 – 100
Sulfato de 4-metilaminofenol	55-55-0	Sólida	Sensibilizante (forte)	Positiva	< 12,5	20 – 200
2,4-Dinitrocloro-benzeno	97-00-7	Sólida	Sensibilizante (extremo)	Positiva	< 12,5	5 – 20

⁽¹⁾ As previsões de riscos e de potencial sensibilizante *in vivo* baseiam-se nos dados LLNA (13). O potencial sensibilizante *in vivo* é obtido por aplicação dos critérios propostos pelo ECETOC (23).

⁽²⁾ Uma previsão KeratinoSens™ deve ser ponderada no âmbito de uma abordagem IATA, em conformidade com os pontos 9 e 11 do presente método de ensaio.

⁽³⁾ Com base nos valores históricos observados (12).

Apêndice 3

CONTROLO DE QUALIDADE DAS MEDIÇÕES DE LUMINESCÊNCIA

Experiência de base para a otimização das medições de luminescência no ensaio KeratinoSens™

Os três parâmetros que se seguem são essenciais para garantir a obtenção de resultados fiáveis com o luminómetro:

- Sensibilidade suficiente que garanta um nível de base estável nos poços de controlo;
- Ausência de gradiente na placa devido a tempos de leitura longos; e
- Ausência de contaminação luminosa dos poços adjacentes por parte de poços fortemente ativos.

Antes do ensaio, recomenda-se que a realização de medições de luminescência adequadas seja assegurada mediante o ensaio de uma placa de controlo do modo que seguidamente se descreve (análise em triplicado).

Placa para o primeiro ensaio exploratório

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	EGDMA 0.98	EGDMA 1.95	EGDMA 3.9	EGDMA 7.8	EGDMA 15.6	EGDMA 31.25	EGDMA 62.5	EGDMA 125	EGDMA 250	EGDMA 500	EGDMA 1000	EGDMA 2000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	CA 4	CA 8	CA 16	CA 32	CA 64	Branco

EGDMA = Dimetacrilato de etilenoglicol (n.º CAS: 97-90-5), produto químico fortemente indutor

CA = Aldeído cinâmico, referência positiva (n.º CAS: 104-55-2)

A análise de controlo de qualidade deve demonstrar:

- resposta clara à dose na linha D, com $I_{\max} > 20$ vezes a resposta de base (na maioria dos casos, obtêm-se valores de $I_{\max}$ entre 100 e 300);

- nenhuma resposta à dose nas linhas C e E (nenhum valor de indução superior a 1,5 — idealmente, não superior a 1,3), devido à possível contaminação luminosa, em especial na vizinhança de poços fortemente ativos na linha EGDMA;
 - nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as linhas A, B, C, E, F e G (isto é, ausência de gradiente na placa); e
 - variabilidade em qualquer das linhas A, B, C, E, F e G, bem como nos poços com DMSO da linha H, inferior a 20 % (ou seja, linha de base estável).
-

B.61 Método de ensaio de difusão de fluoresceína para identificação de corrosivos oculares e de irritantes oculares severos

INTRODUÇÃO

Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 460 (2012) da OCDE. O método de ensaio de difusão de fluoresceína é um método *in vitro* que pode ser utilizado em determinadas circunstâncias, respeitadas determinadas limitações, para atribuir a produtos químicos (substâncias e misturas) a classificação de corrosivos oculares e de irritantes oculares severos, conforme definição do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) da ONU (categoria 1), do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CRE) ⁽¹⁾ (categoria 1), e da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A. (categoria I) (1) (2). Para efeitos do presente método de ensaio, define-se «irritante ocular severo» como sendo um produto químico cuja administração provoca lesões nos tecidos do olho não reversíveis nos 21 dias seguintes ou provoca uma degradação grave da visão e «corrosivo ocular» como sendo um produto químico que provoca lesões irreversíveis nos tecidos do olho. Estes produtos químicos são classificados na categoria 1 do sistema GHS da ONU, na categoria 1 do Regulamento CRE da UE ou na categoria I da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.

Embora o método de difusão de fluoresceína não esteja validado para substituir completamente o ensaio ocular *in vivo* no coelho, recomenda-se a sua integração numa estratégia de ensaio sequencial por etapas para classificação e rotulagem normativas. Recomenda-se, portanto, que este método constitua uma etapa inicial de uma abordagem descendente para a identificação de corrosivos oculares e de irritantes oculares severos, concretamente para determinados tipos de produtos químicos (substâncias e misturas hidrossolúveis) (3) (4).

É geralmente aceite que, no futuro previsível, não estará disponível nenhum ensaio de irritação ocular *in vitro* único, alternativo ao ensaio ocular *in vivo* (método de ensaio B.5 (5)), para previsões em toda a gama de irritação que cubram as diferentes classes de produtos químicos. Porém, a combinação de vários métodos de ensaio alternativos no âmbito de uma estratégia sequencial de ensaio (por etapas) pode substituir-se ao ensaio ocular *in vivo* (4). A abordagem descendente (4) destina-se a ser utilizada quando, com base nas informações disponíveis, for previsível que o produto químico tenha elevado potencial irritante.

Com base no modelo de previsão descrito no ponto 35, este método de ensaio pode, dentro do seu domínio de aplicabilidade, identificar produtos químicos corrosivos oculares ou irritantes oculares severos (categoria 1 no sistema GHS da ONU, categoria 1 do sistema CRE da UE, categoria I da Agência de Proteção do Ambiente do E.U.A.) sem necessidade de ensaios complementares. O mesmo sucede em relação às misturas, embora não se tenham utilizado misturas na validação. O método de ensaio de difusão de fluoresceína pode, portanto, ser utilizado para determinar a corrosão e a irritação oculares provocadas por produtos químicos, no âmbito da estratégia sequencial de ensaio referida no método B.5 (5). Todavia, os produtos químicos que o método de ensaio de difusão de fluoresceína não preveja serem corrosivos oculares nem irritantes oculares severos terão de ser ensaiados por um ou mais métodos adicionais (*in vitro* e/ou *in vivo*) capazes de identificar com exatidão: i) falsos negativos de produtos químicos corrosivos oculares ou de irritantes oculares severos no método de ensaio de detecção de fluoresceína (categoria 1 do sistema GHS da ONU, categoria 1 do Regulamento CRE da UE, categoria I da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.); ii) produtos químicos não classificados em termos de irritação ou corrosão ocular («nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU, nenhuma categoria do Regulamento CRE da UE, categoria IV da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.); iii) produtos químicos moderada ou ligeiramente irritantes oculares (categorias 2A e 2B do sistema GHS da ONU, categoria 2 do Regulamento CRE da UE, categorias II e III da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.).

Na descrição deste método de ensaio, pretende-se explicar o processo utilizado para avaliar o potencial de corrosão ocular ou de irritação ocular severa de um produto químico, medido pela capacidade deste de induzir lesões numa camada epitelial confluyente impermeável. A integridade da permeabilidade transepitelial é uma função primordial do epitélio, como sucede na conjuntiva e na córnea. A permeabilidade transepitelial é controlada por diversas junções oclusivas. Estabeleceu-se uma correlação entre o aumento da permeabilidade do epitélio da córnea *in vivo* e o nível de inflamação e de lesões da superfície observado à medida que a irritação ocular evolui.

No método de ensaio de difusão de fluoresceína, medem-se os efeitos tóxicos de uma curta exposição ao produto químico em estudo determinando o aumento de permeabilidade à fluoresceína de sódio através de uma monocamada epitelial de células renais caninas de Madin-Darby (MDCK) cultivadas em insertos permeáveis. A quantidade de fluoresceína que se difunde é proporcional às lesões induzidas pelo produto químico nas ditas junções oclusivas, nos desmossomas e nas membranas celulares, podendo ser utilizada para estimar potenciais de toxicidade ocular de produtos químicos. O apêndice 1 ilustra células MDCK cultivadas na membrana de um inserto para o método de ensaio de difusão de fluoresceína.

⁽¹⁾ 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).

Estabelecem-se definições no apêndice 2.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

Este método de ensaio baseia-se no protocolo INVITTOX n.º 71 (6), que foi avaliado num estudo de validação internacional realizado pelo Centro Europeu de validação de métodos alternativos (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM), em colaboração com o ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*), dos E.U.A., e com o JaCVAM (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*), do Japão.

Como o demonstrou o estudo de validação, este método não é recomendado para a identificação de produtos químicos aos quais deva ser atribuída a classificação de irritantes ligeiros ou moderados nem de produtos químicos que não tenham de ser classificados em termos de irritação ocular (substâncias e misturas) — ou seja, produtos químicos das categorias 2A/2B ou «nenhuma categoria» do sistema GHS da ONU, da categoria 2 ou de nenhuma categoria do Regulamento CRE da UE ou das categorias II/III/IV da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A. (3) (7).

O método de ensaio só é aplicável a produtos químicos (substâncias e misturas) hidrossolúveis. Em geral, o método de difusão de fluoresceína permite prever com exatidão o potencial de irritação ocular severa dos produtos químicos hidrossolúveis e/ou cujo efeito tóxico não seja afetado pela diluição (7). Para que, nas condições experimentais, possa ser considerado hidrossolúvel, o produto químico deve ser solúvel, a concentrações ≥ 250 mg/ml (uma dose acima do valor-limite de 100 mg/ml), em solução HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) estéril com cálcio (1,0-1,8 mM) isenta de vermelho de fenol. Todavia, se o produto químico em estudo for solúvel a concentração inferior a 100 mg/ml, mas já induzir difusão de fluoresceína de 20 % a essa concentração (ou seja, $DF_{20} < 100$ mg/ml), pode ainda ser classificado na categoria 1 do sistema GHS ou na categoria I da EPA.

As limitações identificadas para este método de ensaio excluem do domínio de aplicabilidade ácidos e bases fortes, fixadores celulares e produtos químicos muito voláteis. Estão associados a estes produtos químicos mecanismos que o método de difusão de fluoresceína não mede, designadamente forte coagulação, saponificação ou reações químicas específicas. Os resultados obtidos para produtos químicos corados e viscosos revelam outras limitações da capacidade de previsão deste método (7). É difícil remover produtos químicos de ambos os tipos da monocamada após o curto período de exposição, admitindo-se que a capacidade de previsão do método de ensaio possa melhorar se o número de lavagens for maior. Por outro lado, os produtos químicos sólidos suspensos em líquidos têm tendência a precipitar, podendo ser difícil determinar a concentração final à qual as células são expostas. Excluindo da base de dados os produtos químicos destas classes físico-químicas, aumenta substancialmente a exatidão do método de difusão de fluoresceína nos sistemas de classificação UE, EPA e GHS (7).

Atendendo aos objetivos deste método de ensaio (apenas a identificação de corrosivos oculares e de irritantes oculares severos), as taxas de falsos negativos (ver o ponto 13) não constituem aspeto crítico, porque os produtos químicos que o ensaio considere negativos são seguidamente ensaiados por outros métodos *in vitro* adequadamente validados ou, em derradeira opção, no coelho, conforme as exigências normativas, por recurso a uma estratégia de ensaio sequencial baseada na ponderação da suficiência da prova (5) (ver também os pontos 3 e 4).

Outras limitações identificadas do método de ensaio de difusão de fluoresceína relacionam-se com as taxas de falsos negativos e de falsos positivos. Quando constituiu etapa inicial de uma abordagem descendente para a identificação de substâncias e misturas hidrossolúveis com efeitos corrosivos ou irritantes severos a nível ocular (categoria 1 do sistema GHS da ONU, categoria 1 do Regulamento CRE da UE, categoria I da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.), a taxa de falsos positivos do método de difusão de fluoresceína variou entre 7 % (7/103, sistema GHS da ONU e Regulamento CRE da UE) e 9 % (9/99, Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.) e a taxa de falsos negativos entre 54 % (15/28, Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.) e 56 % (27/48, sistema GHS da ONU e Regulamento CRE da UE), comparativamente aos resultados *in vivo*. O presente documento não identifica os grupos químicos que geram resultados falsos positivos e/ou falsos negativos no método de ensaio de difusão de fluoresceína.

A cultura de células MDCK tem algumas limitações técnicas próprias. As junções que bloqueiam a passagem do corante fluoresceína de sódio através da monocamada perdem qualidade à medida que aumenta o número de repicagens da cultura celular. Ora, a formação incompleta das junções oclusivas faz aumentar a difusão de fluoresceína nas amostras de controlo (sem o produto químico em estudo). Importa, pois, definir a difusão máxima admissível nas ditas amostras de controlo (ver o ponto 38: difusão de 0 %). Como em todos os ensaios *in vitro*, as células podem sofrer transformações com o tempo, razão pela qual é crucial indicar o número de repicagens correspondente a cada ensaio.

O domínio de aplicabilidade atual poderá ser alargado em determinados casos, mas apenas depois de analisados mais dados relativos a produtos químicos estudados, de preferência resultantes de ensaios (3). Este método de ensaio será atualizado em função dos novos dados e informações que forem sendo examinados.

Os laboratórios que comecem a utilizar este método de ensaio devem recorrer aos produtos químicos para demonstração de competência técnica recomendados no apêndice 3. Antes de apresentarem dados obtidos pelo método de difusão de fluoresceína para efeitos de classificação normativa de perigosidade, os laboratórios podem recorrer aos referidos produtos químicos para comprovar a sua competência técnica na execução deste método.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O método de difusão de fluoresceína é um ensaio *in vitro* de citotoxicidade e de funcionamento celular, realizado numa monocamada confluyente de células epiteliais tubulares MDCK CB997 cultivadas em insertos semipermeáveis, as quais representam um modelo do estado não-proliferativo do epitélio da córnea *in vivo*. A linhagem celular MDCK está bem estabelecida e forma junções oclusivas e desmossomas semelhantes aos encontrados no lado apical do epitélio da conjuntiva e da córnea. *In vivo*, esses desmossomas e junções impedem a penetração de solutos e de matérias exógenas no epitélio da córnea. A perda de impermeabilidade transepitelial em consequência de lesões dos desmossomas e das junções oclusivas é um dos primeiros efeitos da irritação ocular induzida por produtos químicos.

Aplica-se o produto químico em estudo à camada confluyente de células cultivadas no lado apical do inserto. Em geral, a exposição prolonga-se por 1 minuto, para espelhar a velocidade de eliminação normal na exposição humana. Uma das vantagens de um período de exposição curto consiste em as substâncias e misturas em fase aquosa poderem ser ensaiadas tal e qual, se puderem ser facilmente eliminadas depois do período de exposição. Este procedimento permite uma comparação mais direta entre os resultados obtidos e os efeitos do produto químico no ser humano. Em seguida, elimina-se o produto químico em estudo e adiciona-se corante fluoresceína de sódio, não tóxico e com elevada fluorescência, no lado apical da monocamada, mantendo-se o contacto durante 30 minutos. Determinam-se as lesões provocadas pelo produto químico em estudo nas junções oclusivas, quantificando a fluoresceína difundida através da camada celular num período especificado.

Determina-se a quantidade de fluoresceína de sódio que atravessa a monocamada e a membrana do inserto e penetra num dado volume de solução presente no alvéolo para o qual o corante se difunde, medindo por espectrofluorometria a concentração de fluoresceína no alvéolo. Determina-se a quantidade de fluoresceína difundida relativamente às leituras de intensidade de fluorescência correspondentes ao branco de controlo e à amostra de controlo da difusão máxima. Exprime-se a percentagem de difusão e, portanto, a amplitude das lesões causadas nas junções oclusivas, em relação a estas duas amostras de controlo, para cada concentração do produto químico ensaiada. Em seguida, calcula-se o parâmetro DF_{20} , correspondente à concentração que provoca uma variação de 20 % na difusão de fluoresceína relativamente ao valor determinado para a monocamada confluyente não exposta ao produto químico em estudo e os insertos sem células. Utiliza-se o valor DF_{20} (mg/ml) no modelo de previsão para identificar os produtos químicos corrosivos e irritantes severos a nível ocular (ver o ponto 35).

A capacidade de recuperação, igualmente avaliada no ensaio de irritação ocular *in vivo*, constitui um aspeto importante do perfil toxicológico do produto químico. A análise preliminar indica que os dados de capacidade de recuperação (até 72 h após a exposição ao produto químico em estudo) poderiam eventualmente melhorar a capacidade de previsão do Protocolo INVITTOX n.º 71. Porém, é necessário explorar melhor este assunto e dispor de mais dados, de preferência provenientes de ensaios complementares (6). Este método de ensaio será atualizado em função dos novos dados e informações que se forem examinando.

PROTOCOLO DE ENSAIO

Preparação da monocamada celular

Prepara-se uma monocamada de células MDCK CB997 utilizando células subconfluentes cultivadas em frascos de cultivo em meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)/mistura nutritiva F12 (concentrado × 1 com L-glutamina, tampão HEPES 15 mM, cálcio (1,0 a 1,8 mM) e soro bovino fetal (FCS/FBS) a 10 % inativado pelo calor). Para garantir a formação e a integridade das junções oclusivas, é importante que os meios e soluções utilizados no ensaio de difusão de fluoresceína contenham cálcio em concentração compreendida entre 1,8 mM (200 mg/l) e 1,0 mM (111 mg/l). Para garantir uma formação regular e reprodutível das junções oclusivas, é necessário controlar o número de repicagens. De preferência, as células devem ter sido obtidas após 3 a 30 repicagens a partir de células descongeladas, pois as células nesta gama de número de repicagens têm funcionalidades semelhantes, o que favorece a reprodutibilidade dos resultados dos ensaios.

Antes de se proceder ao ensaio de difusão de fluoresceína, destacam-se as células do frasco por tripsinização, centrifuga-se e inocula-se uma quantidade adequada de células nos insertos inseridos nas placas de 24 alvéolos (ver o apêndice 1). Inoculam-se as células em insertos de 12 mm de diâmetro dotados de uma membrana de ésteres celulósicos mistos, com 80 a 150 μm de espessura e poros de 0,45 μm . No estudo de validação, utilizaram-se insertos Millicell-HA de 12 mm. As propriedades do inserto e o tipo de membrana são importantes, pois podem afetar o crescimento celular e a ligação do produto químico em estudo. Os produtos químicos de certos tipos podem ligar-se à membrana dos insertos Millicell-HA, o que é suscetível de influenciar a interpretação dos resultados. A fim de comprovar a equivalência de outros tipos de membranas eventualmente utilizados, utilizam-se os produtos químicos para demonstração de competência técnica recomendados no apêndice 3.

A ligação química à membrana do inserto é mais comum no caso dos compostos catiónicos, como o cloreto de benzalcónio, que são atraídos para a membrana carregada (7). A ligação química à membrana do inserto pode aumentar o período de exposição ao produto químico em estudo, com a consequente sobrestimação do potencial tóxico deste, mas também pode reduzir a difusão de fluoresceína através do inserto, dada a ligação do corante ao composto químico catiónico ligado à membrana do inserto, com a consequente subestimação do potencial tóxico do produto químico em estudo. Para avaliar estes fenómenos, pode expor-se unicamente a membrana à concentração máxima do produto químico em estudo, adicionando em seguida o corante fluoresceína de sódio à concentração normal, durante o período de exposição normal (sem células de controlo). Caso a fluoresceína de sódio se ligue, a membrana do inserto apresentar-se-á amarelada depois da lavagem de eliminação do produto químico. Por conseguinte, é essencial conhecer as propriedades de ligação do produto químico em estudo para interpretar corretamente o efeito deste nas células.

Ao iniciar-se a exposição ao produto químico em estudo, as células inoculadas nos insertos já devem ter formado uma monocamada confluenta. Devem ser transferidas para cada inserto $1,6 \times 10^5$ células (400 μl de uma suspensão celular de 4×10^5 células/ml). Nestas condições, normalmente obtém-se uma monocamada confluenta após 96 horas de cultura. Antes da inoculação, é necessário examinar visualmente os insertos, para garantir que as lesões eventualmente detetadas no exame visual referido no ponto 30 sejam de facto devidas à manipulação dos insertos.

Conservam-se as culturas de células MDCK em incubadores à temperatura de 37 ± 1 °C, numa atmosfera humidificada com $5\% \pm 1\%$ de CO_2 . As células devem estar isentas de contaminações por bactérias, vírus, micoplasmas ou fungos.

Aplicação dos produtos químicos em estudo e de controlo

É necessário preparar uma solução de reserva fresca do produto químico em estudo para cada série de ensaios e utilizá-la nos 30 minutos seguintes. Para evitar ligações às proteínas séricas, prepara-se cada produto químico em estudo numa solução HBSS isenta de vermelho de fenol, cuja concentração de cálcio se situe entre 1,0 mM e 1,8 mM. Antes do ensaio, é necessário avaliar a solubilidade do produto químico em estudo em HBSS, à concentração de 250 mg/ml. Se o produto químico em estudo se mantiver em suspensão ou emulsão estável a esta concentração (isto é, mantém-se uma única fase uniforme, sem decantação nem separação de fases) durante 30 minutos, pode utilizar-se o HBSS como solvente. Caso se verifique que o produto químico em estudo é insolúvel em HBSS a esta concentração, será de ponderar o recurso a métodos de ensaio diversos do método de difusão de fluoresceína. Nos casos em que se verifique a insolubilidade do produto químico em HBSS, deve ser-se prudente na utilização de derivados do petróleo leves como solvente, pois os dados disponíveis são insuficientes para se tirarem conclusões sobre o funcionamento do ensaio de difusão de fluoresceína nessas condições.

Preparam-se as seguintes concentrações (massa/volume) de cada produto químico em estudo, em solução HBSS proveniente da solução de reserva (isenta de vermelho de fenol e com concentração de cálcio compreendida entre 1,0 mM e 1,8 mM): 1, 25, 100, 250 mg/ml e uma solução não-diluída ou saturada. Quando o estudo incide num produto químico sólido, deve incluir-se uma concentração muito elevada (750 mg/ml). Esta concentração do produto químico em estudo pode ter de ser aplicada às células por meio de uma pipeta volumétrica. Caso surjam efeitos tóxicos entre 25 mg/ml e 100 mg/ml, será necessário ensaiar duas vezes as seguintes concentrações adicionais: 1, 25, 50, 75 e 100 mg/ml. Cumpridos os critérios de aceitação, determina-se o valor de DF_{20} a partir destas concentrações.

Aplica-se o produto químico em estudo às monocamadas celulares confluentes depois de se retirar o meio de cultura das células e de lavar duas vezes com HBSS tépido (37 °C) esterilizado (isento de vermelho de fenol e com concentração de cálcio compreendida entre 1,0 mM e 1,8 mM). Antes disso, verifica-se visualmente se os filtros têm alguma lesão que pudesse ser indevidamente atribuída a potenciais incompatibilidades com o produto químico em estudo. Devem ser utilizados em cada série de ensaios pelo menos três replicados de cada concentração do produto químico em estudo e de cada amostra de controlo. Após 1 minuto de exposição à temperatura ambiente, remove-se cuidadosamente o produto químico em estudo por aspiração, lava-se a monocamada duas vezes com HBSS tépido (37 °C) esterilizado (isento de vermelho de fenol e com concentração de cálcio compreendida entre 1,0 mM e 1,8 mM) e mede-se imediatamente a difusão de fluoresceína.

Devem ser incluídas em cada série de ensaios as necessárias amostras de controlo negativas (CN) e positivas (CP) correspondentes, para demonstrar que a integridade da monocamada (CN) e a sensibilidade das células (CP) se situam no intervalo histórico de aceitabilidade definido. Sugere-se como amostra de controlo positiva o Brij 35 (n.º CAS 9002-92-0), à concentração de 100 mg/ml. Esta concentração deve gerar uma difusão de fluoresceína (lesão da camada celular) de 30 % (intervalo de aceitabilidade da difusão de fluoresceína: 20-40 %). Para amostra de controlo negativa (branco sem o produto químico em estudo, de controlo), sugere-se HBSS isento de vermelho de fenol e com concentração de cálcio compreendida entre 1,0 mM e 1,8 mM. Para permitir o cálculo dos valores de DF_{20} , deve incluir-se em cada ensaio uma amostra de controlo da difusão máxima. Determina-se a difusão máxima utilizando um inserto de controlo, sem células.

Determinação da permeabilidade à fluoresceína

Imediatamente após a remoção dos produtos químicos em estudo e de controlo, adicionam-se aos insertos (Millicell-HA, por exemplo) 400 µl de solução 0,1 mg/ml de fluoresceína de sódio (0,01 % (m/v) em HBSS isento de vermelho de fenol e com concentração de cálcio compreendida entre 1,0 e 1,8 mM). Mantêm-se as culturas à temperatura ambiente durante 30 minutos. No final do período de incubação com fluoresceína, retiram-se cuidadosamente os insertos de cada alvéolo. Examina-se atentamente cada filtro e registam-se todas as lesões que possam ter sido causadas por manipulações.

Removidos os insertos, determina-se quantitativamente, na solução remanescente nos alvéolos, a fluoresceína que se difundiu através da monocamada e do inserto. Efetuam-se as medições com um espectrofluorímetro aos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 485 nm e 530 nm, respetivamente. É necessário regular a sensibilidade do espectrofluorímetro de modo a obter a máxima diferença numérica possível entre a máxima difusão de fluoresceína (insertos sem células) e a difusão de fluoresceína mínima (insertos com exposição da monocamada confluenta unicamente à amostra de controlo negativa). Devido às diferenças entre os espectrofluorímetros utilizados, sugere-se a regulação de uma sensibilidade que permita obter uma intensidade de fluorescência superior a 4 000 para a amostra de controlo da difusão máxima de fluoresceína. O valor máximo de difusão de fluoresceína não deve exceder 9 999. A intensidade máxima de difusão de fluoresceína deve estar compreendida na gama de linearidade do espectrofluorímetro utilizado.

Interpretação dos resultados e modelo de previsão

Em termos quantitativos, a difusão de fluoresceína é proporcional às lesões induzidas pelo produto químico nas junções oclusivas. Calcula-se a percentagem de difusão de fluoresceína correspondente a cada concentração do produto químico em estudo a partir dos valores de difusão do corante obtidos para o produto químico em estudo, em termos comparativos relativamente aos valores de difusão de fluoresceína correspondentes à amostra de controlo negativa (leitura correspondente à monocamada confluenta de células exposta à amostra de controlo negativa) e a uma amostra de controlo da difusão máxima (leitura correspondente à difusão de fluoresceína através de um inserto desprovido de células).

Valor médio da intensidade de fluorescência correspondente à difusão máxima = x

Valor médio da intensidade de fluorescência correspondente à difusão de 0 % = y

Obtém-se o valor médio correspondente à difusão de 100 % subtraindo ao valor médio correspondente à difusão máxima o valor médio correspondente à difusão de 0 %, ou seja:

$$x - y = z$$

Obtém-se a percentagem de difusão correspondente a cada dose fixa subtraindo o valor médio correspondente à difusão de 0 % ao valor médio (m) das leituras de intensidade de fluorescência correspondentes aos três replicados e dividindo depois o resultado desta operação pelo valor médio correspondente à difusão de 100 %; ou seja: % DF = $[(m-y) / z] \times 100$ %, em que:

m = valor médio das intensidades de fluorescência medidas para os três replicados da concentração em causa,

% DF = percentagem de fluoresceína difundida através da camada celular.

Para calcular a concentração do produto químico que causa uma difusão de fluoresceína de 20 % aplica-se a seguinte equação:

$$DF_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

em que:

D = percentagem de inibição,

A = percentagem de lesões (difusão de fluoresceína de 20 %),

B = percentagem de difusão de fluoresceína inferior a A,

C = percentagem de difusão de fluoresceína superior a A,

M_C = concentração (mg/ml) correspondente a C,

M_B = concentração (mg/ml) correspondente a B.

Indica-se a seguir o critério-limiar de DF₂₀ utilizado para prever propriedades de corrosão ocular ou de irritação ocular severa de produtos químicos:

DF ₂₀ (mg/ml)	CR no sistema GHS da ONU	CR no Regulamento CRE da UE	CR no sistema da EPA (E.U.A.)
≤ 100	Categoria 1	Categoria 1	Categoria I

CR: classificação e rotulagem.

Recomenda-se o recurso ao método de difusão de fluoresceína unicamente para identificar corrosivos oculares ou irritantes oculares severos que sejam hidrossolúveis (categoria 1 do sistema GHS da ONU, categoria 1 do Regulamento CRE da UE, categoria I da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.) (ver os pontos 1 e 10).

Para que possa ser atribuída a um produto químico (substância ou mistura) hidrossolúvel (3) (6) (7) a classificação de «indutor de lesões oculares graves» (categoria 1 do sistema GHS da ONU e também do Regulamento CRE da UE) ou de «corrosivo ocular ou irritante ocular severo» (categoria I da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.), o produto químico deve induzir DF₂₀ a concentração igual ou inferior a 100 mg/ml.

Aceitação dos resultados

O valor médio correspondente à máxima difusão de fluoresceína (x) deve ser superior a 4 000 (ver o ponto 31); o valor médio correspondente à difusão de fluoresceína de 0 % (y) deve ser igual ou inferior a 300; o valor médio correspondente à difusão de fluoresceína de 100 % (z) deve estar compreendido entre 3 700 e 6 000.

Considera-se o ensaio aceitável se a amostra de controlo positiva gerar na camada celular um nível de lesões compreendido entre 20 % e 40 % (expresso em percentagem de difusão de fluoresceína).

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

Para cada série de ensaios, devem ser apresentados num quadro os dados respeitantes a cada alvéolo replicado (por exemplo: valores de intensidade de fluorescência e percentagens de difusão de fluoresceína correspondentes ao produto químico estudado, bem como a respetiva classificação). Devem igualmente ser indicadas as médias ± desvio-padrão das medições correspondentes aos replicados conexos de cada série de ensaios.

Relatório do ensaio

Elementos a constar do relatório do ensaio:

Produtos químicos em estudo e de controlo

- Denominação ou denominações químicas, como a denominação estrutural utilizada pelo *Chemical Abstracts Service* (CAS), seguida de outras denominações, se existirem;
- Número de registo CAS do produto químico, se conhecido;
- Grau de pureza e composição da substância ou mistura (em percentagem ponderal), se conhecidas;
- Propriedades físico-químicas (por exemplo: estado físico, volatilidade, pH, estabilidade, hidrossolubilidade, classe química) relevantes para a realização do estudo;
- Tratamento prévio do produto químico em estudo/de controlo, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);
- Condições de armazenagem.

Justificação do método e do protocolo de ensaio utilizados

- Nomeadamente considerações relativas ao domínio de aplicabilidade e às limitações do método de ensaio.

Condições de realização do ensaio

- Descrição do sistema celular utilizado, incluindo o certificado de autenticidade e o estado micoplasmático da linhagem celular;
- Pormenores sobre o protocolo de ensaio seguido;
- Concentração(ões) do produto químico em estudo utilizada(s);
- Tempo de exposição ao produto químico em estudo;
- Duração da incubação com fluoresceína;
- Descrição de eventuais modificações do protocolo do ensaio;
- Descrição dos critérios de avaliação utilizados;
- Referência a dados históricos do modelo (por exemplo: amostras de controlo positivas e negativas e produtos químicos de referência, se for o caso);
- Informações sobre a competência técnica comprovada pelo laboratório.

Resultados

- Quadro dos dados respeitantes ao produto químico em estudo e às amostras de controlo correspondentes a cada série de ensaios e a cada replicado (incluindo cada resultado, os correspondentes valores médios e os respetivos desvios-padrão);
- Classificação(ões) atribuída(s), mencionando o modelo de previsão e/ou os critérios de decisão utilizados;
- Descrição de outros efeitos eventualmente observados.

Discussão dos resultados

- Deve incluir considerações relativas a eventuais resultados inconclusivos (ponto 35: $DF_{20} > 100$ mg/ml) e ensaios complementares.

Conclusões

REFERÊNCIAS

- 1) ONU (2009), Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS), terceira edição, revista. Nova Iorque e Genebra, Publicações das Nações Unidas. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponível em: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]
- 2) U.S. EPA (1996). Label Review Manual, 2.^a edição, EPA737-B-96-001, Washington DC., Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.
- 3) CE-ECVAM (2009). Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.
- 4) Scott, L., *et al.* (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. In Vitro*, 24, 1-9.
- 5) Capítulo B.5 deste anexo, «Irritação/corrosão ocular agudas»
- 6) CE-ECVAM (1999). INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test. European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Ispra, Itália. Disponível em: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>]
- 7) CE-ECVAM (2008). Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.
- 8) OCDE (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. OCDE, Paris.

Apêndice 1

DIAGRAMA DE CÉLULAS MDCK CULTIVADAS NA MEMBRANA DE UM INSERTO PARA O MÉTODO DE ENSAIO DE DIFUSÃO DE FLUORESCÉINA

Cultiva-se uma camada confluyente de células MDCK numa membrana semipermeável de um inserto. Introduzem-se os insertos nos alvéolos de placas de 24 alvéolos.

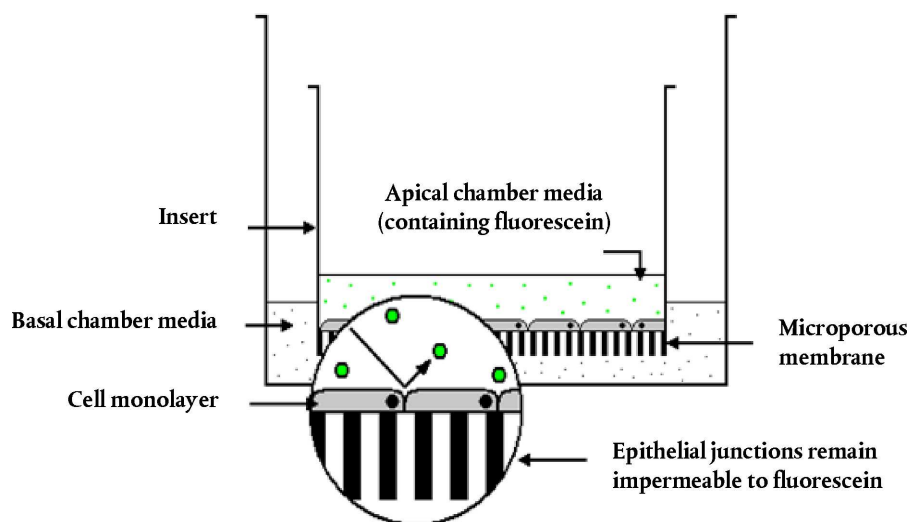


Figura proveniente de: Wilkinson, P.J. (2006). Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure. Ph.D. Thesis, Universidade de Nottingham, Reino Unido.

Apêndice 2

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida da eficiência do método e um dos aspetos da «adequação». Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos do método de ensaio.

Produto químico: Substância ou mistura.

Categoria I da EPA: Produtos químicos com ação corrosiva (destruição irreversível de tecido ocular) ou de afeção ou irritação da córnea que se mantém durante mais de 21 dias (2).

Regulamento CRE da UE: (Regulamento (CE) n.º 1272/2008, relativo à Classificação, Rotulagem e Embalagem de Substâncias e Misturas): Aplica na União Europeia (UE) o sistema GHS da ONU de classificação de produtos químicos (substâncias e misturas).

Taxa de falsos negativos: Proporção dos produtos químicos positivos que o método de ensaio considera, erradamente, negativos. É um dos indicadores da eficiência dos métodos de ensaio.

Taxa de falsos positivos: Proporção dos produtos químicos negativos que o método de ensaio considera, erradamente, positivos. É um dos indicadores da eficiência dos métodos de ensaio.

DF₂₀: Parâmetro que pode ser estimado determinando a concentração à qual o produto químico em estudo provoca 20 % de difusão de fluoresceína através da camada celular.

Difusão de fluoresceína: Quantidade de fluoresceína que atravessa a camada celular, medida por um método espectrofluorométrico.

Sistema GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, da Organização das Nações Unidas — ONU): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e que trata ainda dos elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência etc.) e do ambiente.

Categoria 1 do sistema GHS: Lesão do tecido ocular ou degradação grave da visão em consequência da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, suscetível de causar efeitos adversos num organismo, sistema ou (sub)população que seja exposto ao agente em causa.

Mistura: No contexto do sistema GHS da ONU, mistura ou solução constituída por duas ou mais substâncias que nela não reagem.

Amostra de controlo negativa: Replicado não-tratado que contém todos os componentes do sistema de ensaio. Esta amostra é ensaiada juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para determinar se o solvente interage com o sistema de ensaio.

Não-classificado: Produtos químicos não classificados nas categorias 1, 2A ou 2B do sistema GHS da ONU, não classificados nas categorias 1 ou 2 do Regulamento CRE da UE ou não classificados nas categorias I, II ou III de irritantes oculares da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.

Corrosivo ocular: a) Produto químico que provoca lesões irreversíveis dos tecidos do olho; b) Produto químico classificado na categoria 1 do sistema GHS da ONU, na categoria 1 do Regulamento CRE da UE ou na categoria I de irritantes oculares da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.

Irritante ocular: a) Produto químico que, aplicado na superfície anterior do olho, provoca alterações reversíveis no olho; b) Produto químico classificado nas categorias 2A ou 2B do sistema GHS da ONU, na categoria 2 do Regulamento CRE da UE ou nas categorias II ou III de irritantes oculares da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.

Irritante ocular severo: a) Produto químico que, aplicado na superfície anterior do olho, provoca lesões dos tecidos do olho não reversíveis nos 21 dias seguintes ou que provoca uma degradação grave da visão; b) Produto químico classificado na categoria 1 do sistema GHS da ONU, na categoria 1 do Regulamento CRE da UE ou na categoria I de irritantes oculares da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.

Amostra de controlo positiva: Replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com um produto químico que comprovadamente induz reação positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade, ao longo do tempo, da reação a esta amostra de controlo, a reação não deve ser extrema.

Produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica: Série de produtos químicos da lista de produtos químicos de referência que os laboratórios que iniciam a aplicação do método podem utilizar para comprovar a sua competência técnica na execução do método de ensaio de referência validado.

Adequação: Relação do ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (8).

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial, bem como da repetibilidade intralaboratorial.

Ensaio alternativo: Ensaio destinado a substituir um ensaio de rotina aceite para identificação de perigos e/ou avaliação de riscos, que se concluiu proporcionar proteção equivalente, ou melhorar a proteção, da saúde pública e animal ou do ambiente, consoante o caso, comparativamente ao ensaio de rotina aceite, no que respeita a todos os produtos químicos e situações de ensaio possíveis.

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (8).

Lesões oculares graves: Lesão do tecido ocular ou degradação grave da visão em consequência da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação.

Amostra de controlo do solvente/excipiente: Amostra não-tratada que contém todos os componentes do sistema de ensaio, incluindo o solvente ou excipiente, e é ensaiada, juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para estabelecer a linha de base de reação para as amostras tratadas com o produto químico em estudo, dissolvido no mesmo solvente ou excipiente. Quando ensaiada com uma amostra de controlo negativa correspondente, esta amostra também permite determinar se o solvente ou excipiente interage com o sistema de ensaio.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio.

Substância: Utiliza-se no contexto do sistema GHS da ONU para designar os elementos químicos e os compostos destes, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo solventes que possam ser separados sem afetar a estabilidade da substância nem lhe modificar a composição.

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

Estratégia de ensaio sequencial por etapas: Estratégia sequencial de ensaio em que, seguindo uma ordem estabelecida, se avalia toda a informação disponível sobre o produto químico em estudo, por um processo baseado na ponderação da suficiência da prova em cada etapa, com o objetivo de determinar se há informação suficiente para uma decisão de classificação de perigosidade antes de passar à etapa seguinte. Se a informação existente possibilitar a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, não serão necessários mais ensaios. Se a informação existente não possibilitar a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, procede-se a uma série de ensaios sequenciais em animais até ser possível atribuir uma classificação inequívoca.

Método de ensaio validado: Método de ensaio relativamente ao qual foram concluídos estudos de validação com vista a determinar a sua adequação (incluída a exatidão) e a sua fiabilidade para um determinado fim. Importa referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exato e fiável para se considerar aceitável para o fim pretendido (8).

Ponderação da suficiência da prova: Processo que consiste em ponderar os pontos fortes e os pontos fracos dos vários elementos de informação para tirar conclusões fundamentadas sobre o potencial de perigosidade do produto químico.

Apêndice 3

PRODUTOS QUÍMICOS RECOMENDADOS PARA DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA TÉCNICA NO MÉTODO DE ENSAIO DE DIFUSÃO DE FLUORESCÉINA

Antes de este método de ensaio passar a ser utilizado por rotina, os laboratórios devem comprovar a sua competência técnica identificando corretamente a classificação de corrosividade ocular dos oito produtos químicos recomendados no quadro 1. Estes produtos químicos foram selecionados de modo a representarem a gama de reações de corrosão ou de irritação ocular local baseada nos resultados do ensaio ocular *in vivo* no coelho (TG 405, método de ensaio B.5 (5)) — ou seja, as categorias 1, 2A, 2B ou nenhuma classificação segundo o sistema GHS da ONU. Porém, atendendo à utilização do ensaio de difusão de fluoresceína que se encontra validada (unicamente a identificação de corrosivos oculares e de irritantes oculares severos), apenas há que demonstrar competência em relação a dois resultados classificativos obtidos no ensaio (corrosivo/irritante severo e não-corrosivo/não-irritante severo). Outros critérios de seleção foram a disponibilidade do produto químico no comércio, a existência de dados de referência *in vivo* de alta qualidade e a existência de dados de alta qualidade pelo método de difusão de fluoresceína. Foi nesta base que se selecionaram os produtos químicos a recomendar para a demonstração de competência técnica do *Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing* (8), documento utilizado na validação retrospectiva do método de ensaio de difusão de fluoresceína.

Quadro 1

Produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica no método de ensaio de difusão de fluoresceína.

Produto químico	N.º de registo CAS	Classe química ⁽¹⁾	Fase	Classificação <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Classificação <i>in vitro</i> ⁽³⁾
Cloreto de benzalcónio (5 %)	8001-54-5	Sal de amónio quaternário	Líquida	Categoria 1	Corrosivo/irritante severo
Cloridrato de prometazina	58-33-3	Amina/amidina, composto heterocíclico, composto organosulfurado	Sólida	Categoria 1	Corrosivo/irritante severo
Hidróxido de sódio (10 %)	1310-73-2	Composto alcalino	Líquida	Categoria 1	Corrosivo/irritante severo
Laurilsulfato de sódio (15 %)	151-21-3	Ácido carboxílico (sal)	Líquida	Categoria 1	Corrosivo/irritante severo
4-Carboxibenzaldeído	619-66-9	Ácido carboxílico, aldeído	Sólida	Categoria 2(A)	Não-corrosivo/não-irritante severo
Nitrato de amónio	6484-52-2	Sal inorgânico	Sólida	Categoria 2(A)	Não-corrosivo/não-irritante severo
2-Metilacetoacetato de etilo	609-14-3	Cetona, éster	Líquida	Categoria 2(B)	Não-corrosivo/não-irritante severo
Glicerol	56-81-5	Álcool	Líquida	Nenhuma categoria	Não-corrosivo/não-irritante severo

Abreviaturas: N.º de registo CAS = Número de registo do *Chemical Abstracts Service*.

⁽¹⁾ Os produtos químicos foram classificados em classes químicas segundo um sistema normalizado, com base nos Medical Subject Headings («classificadores de temas médicos», MeSH) da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos da América (<http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Com base nos resultados do ensaio ocular *in vivo* no coelho (TG 405 da OCDE, método de ensaio B.5) e nos sistemas GHS da ONU e do Regulamento CRE da UE.

⁽³⁾ Com base nos resultados obtidos no método de difusão de fluoresceína (protocolo INVITTOX n.º 71 (6)).

B.62 Ensaio dos cometas *in vivo* com células de mamíferos em meio alcalino

INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 489 (2016) da OCDE. O ensaio dos cometas *in vivo* com células de mamíferos em meio alcalino, por eletroforese em gel de células isoladas (a seguir designado simplesmente por «ensaio dos cometas») serve para a deteção de quebras em cadeias do ADN de células ou núcleos isolados de vários tecidos de animais, geralmente roedores, que tenham sido expostos a matérias potencialmente genotóxicas. O ensaio dos cometas foi revisto e diversos grupos de peritos publicaram recomendações — (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). O presente método faz parte de uma série de métodos de ensaio sobre toxicologia genética. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente efetuadas às orientações da OCDE nesse domínio (11).

O objetivo do ensaio dos cometas é identificar produtos químicos que provoquem danos no ADN. Em condições alcalinas (pH > 13), o ensaio dos cometas permite detetar quebras simples ou duplas, resultantes, por exemplo, de interações diretas com o ADN, de sítios lábeis em meio alcalino ou em consequência de quebras transientes de cadeias de ADN resultantes da reparação de excisões. Estas quebras de cadeia podem ser reparadas de forma a não produzirem efeitos persistentes, podem ser fatais para a célula ou podem ser fixadas numa mutação de que resulte uma alteração viável permanente. Podem também conduzir a lesões cromossómicas associadas a muitas doenças humanas, nomeadamente o cancro.

No período 2006-2012, realizou-se um ensaio de validação formal do ensaio dos cometas *in vivo* com roedores, coordenado pelo centro japonês para a validação de métodos alternativos (JaCVAM), em cooperação com o CEVMA (Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos), o ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) e o NICEATM (*Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods*) (12). Este método de ensaio abrange a utilização recomendada e as limitações do ensaio dos cometas e assenta no protocolo final (12) utilizado no estudo de validação, bem como em outros dados relevantes, publicados ou não (neste último caso, propriedade de laboratórios).

Os termos-chave são definidos no apêndice 1. De notar que podem ser utilizadas no ensaio muitas plataformas diferentes (lâminas de microscópio, gotas de gel, placas de 96 poços, etc.). Por motivos de conveniência, utiliza-se o termo «lâmina» em todo o documento, embora abranja todas as outras plataformas.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

O ensaio dos cometas é um método de determinação de quebras da cadeia do ADN em células eucariotas. As células/núcleos isolados, incorporados em agarose, numa lâmina, são lisados com detergente e uma elevada concentração de sal. Esta etapa de lise digere as membranas das células e dos núcleos e permite a libertação de fragmentos de hélices de ADN geralmente chamados nucleóides e fragmentos de ADN. A eletroforese a pH elevado produz estruturas semelhantes a cometas que, por recurso a corantes fluorescentes adequados, podem ser observados por microscopia de fluorescência; Os fragmentos de ADN deslocam-se da «cabeça» para a «cauda» em função das suas dimensões. A intensidade da cauda do cometa em relação à intensidade total (cabeça e cauda) reflete a proporção da rutura do ADN (13) (14) (15).

O ensaio dos cometas *in vivo* em meio alcalino é especialmente importante para avaliar a genotoxicidade, na medida em que as respostas dependem da absorção, da distribuição, do metabolismo e da excreção *in vivo*, bem como dos processos de reparação do ADN. Estes podem variar, consoante as espécies, em função dos tecidos e dos tipos de lesões do ADN.

De forma a atender aos requisitos de bem-estar animal, nomeadamente a redução do recurso a animais de acordo com a regra dos três R (em inglês *Replacement, Reduction, Refinement* — substituição, redução, refinamento), o ensaio pode ser combinado com outros estudos toxicológicos, como estudos de toxicidade de dose repetida (10) (16) (17), podendo também o parâmetro ser combinado com outros parâmetros de genotoxicidade, como o ensaio *in vivo* de micronúcleos em células de mamíferos (18) (19) (20). Na maioria dos casos, o ensaio dos cometas utiliza roedores, embora tenha já sido aplicado a outras espécies de mamíferos e não-mamíferos. A utilização de espécies diferentes dos roedores deve ser justificada cientificamente e eticamente, caso a caso, recomendando-se vivamente que o ensaio dos cometas seja efetuado com essas espécies apenas no contexto de outro estudo de toxicidade, e não de forma autónoma.

A seleção da via de exposição e dos tecidos a estudar deve basear-se em todos os dados disponíveis sobre os produtos químicos em estudo, como a via prevista de exposição humana, o metabolismo e a distribuição, o potencial de efeitos no local de contacto, os alertas estruturais, outros dados de toxicidade ou de genotoxicidade e o objetivo do estudo. Assim, se pertinente, o potencial genotóxico dos produtos químicos em estudo pode ser determinado nos tecidos que são alvo dos efeitos cancerígenos e/ou de outros efeitos tóxicos. O ensaio é também considerado útil para a investigação suplementar da genotoxicidade detetada por um sistema *in vitro*. É conveniente efetuar um ensaio dos cometas *in vivo* num tecido de interesse nos casos em que se possa razoavelmente esperar que esse tecido sofrerá uma exposição adequada.

O ensaio foi objeto de uma validação mais extensiva com tecidos somáticos de ratos machos em estudos de colaboração, nomeadamente os promovidos pelo JACVAM (12) e por Rothfuss *et al.*, 2010 (10). O estudo de validação internacional do JACVAM utilizou tecidos do fígado e do estômago. A utilização do fígado deveu-se a este ser o órgão mais ativo no metabolismo dos produtos químicos e também, frequentemente, um órgão-alvo de carcinogenicidade. Quanto ao estômago, é geralmente primeiro ponto de contacto dos produtos químicos após exposição oral, embora outras áreas do trato gastrointestinal, como o duodeno e o jejuno, devam também ser consideradas tecidos de contacto, eventualmente mais relevantes para os seres humanos do que o estômago glandular dos roedores. Deve ter-se o cuidado de assegurar que os tecidos em causa não são expostos a concentrações excessivas do produto químico em estudo (21). Em princípio, a técnica é aplicável a todos os tecidos dos quais se possam obter suspensões analisáveis de células/núcleos isolados. Dados de propriedade industrial de vários laboratórios demonstram a sua aplicação com êxito a uma grande diversidade de tecidos, existindo muitas publicações que demonstram a aplicabilidade da técnica a órgãos ou tecidos para além do fígado e do estômago, como, p. ex., o jejuno (22), os rins (23) (24), a pele (25) (26), a bexiga urinária (27) (28), os pulmões e as células de lavagem broncoalveolar (importante para estudos de inalação de produtos químicos) (29) (30); também se realizaram ensaios com vários órgãos (31) (32).

Embora possa haver interesse no estudo dos efeitos genotóxicos em células germinativas, deve notar-se que a norma de ensaio dos cometas em meio alcalino descrita no presente método de ensaio não se considera adequada para determinar quebras da cadeia do ADN de células germinativas maduras. Dado que uma análise da bibliografia sobre a utilização do ensaio dos cometas para avaliar a genotoxicidade em células germinativas (33) revelou níveis de fundo elevados e variáveis de danos no ADN, considera-se necessário efetuar alterações ao protocolo, além de estudos de normalização e validação mais aprofundados, para que o método de ensaio dos cometas possa abranger células germinativas maduras (por exemplo, espermatozoides). Acresce que o regime de exposição recomendado, que o presente método de ensaio descreve, não é ideal, sendo necessárias exposições e tempos de amostragem mais longos para uma análise significativa das quebras de cadeias de ADN em espermatozoides maduros. A bibliografia (34) (35) descreve efeitos genotóxicos determinados pelo ensaio dos cometas em células testiculares, em diferentes fases da diferenciação. De notar, contudo, que as gónadas contêm uma mistura de células somáticas e germinativas. Por isso, a obtenção de resultados positivos na generalidade dos tecidos provenientes das gónadas (testículos) não reflete necessariamente a ocorrência de danos nas células germinativas; indica, porém, que o(s) produto(s) químico(s) em estudo(s) e/ou os seus metabolitos atingiram esses tecidos.

As condições experimentais-padrão do ensaio dos cometas não permitem detetar de forma fiável a ocorrência de ligações cruzadas. Em determinadas condições experimentais modificadas, é possível detetar ligações cruzadas ADN-ADN e ADN-proteína, bem como outras alterações, como bases oxidadas (23) (36) (37) (38) (39). São, contudo, necessários trabalhos complementares para caracterizar de forma adequada as modificações necessárias ao protocolo. Assim, a deteção de agentes de reticulação não constitui o objetivo principal do ensaio descrito. O ensaio não é adequado, mesmo com alterações, para detetar aneugénios.

No estado atual dos conhecimentos, o ensaio dos cometas *in vivo* apresenta várias limitações adicionais (ver apêndice 3). Prevê-se que o método de ensaio seja revisto no futuro e, se necessário, adaptado em função da experiência adquirida.

Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados com fins regulamentares, importa ponderar se — e, em caso afirmativo, por que motivo — o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Tais considerações são dispensáveis se houver um requisito regulamentar para o ensaio da mistura.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Os animais são expostos ao produto químico em estudo por uma via apropriada. Nos pontos 36-40 faz-se uma descrição pormenorizada do doseamento e da recolha de amostras. No(s) tempo(s) de amostragem selecionado(s), dissecam-se os tecidos de interesse e preparam-se as suspensões de células/núcleos (se se considerar útil, pode efetuar-se perfusão *in situ*, p. ex., do fígado), que se integram em ágar macio, de forma a imobilizá-las nas lâminas. As células ou os núcleos são tratados com tampão de lise, para remover a membrana celular e/ou nuclear, e expostos a um álcali forte (p. ex., a $\text{pH} \geq 13$), para permitir o desenrolamento e a libertação de lacetes e fragmentos de ADN. O ADN nuclear presente no ágar é então sujeito a eletroforese. As moléculas de ADN normais não fragmentadas permanecem na posição em que o ADN nuclear foi colocado no ágar, enquanto os fragmentos e lacetes de ADN libertados migram para o ânodo. Após a eletroforese, o ADN é visualizado por recurso a um corante de fluorescência adequado. As preparações são analisadas por recurso a um microscópio e a sistemas de análise de imagens automáticos ou semiautomáticos. A quantidade de ADN que migrou durante a eletroforese e a distância de migração refletem a quantidade e a dimensão dos fragmentos de ADN. O ensaio dos cometas permite avaliar vários parâmetros. Recomenda-se utilizar a quantidade de ADN presente na «cauda» (percentagem de ADN de «cauda» ou intensidade percentual da «cauda») para avaliar os danos sofridos pelo ADN (12) (40) (41) (42). Após a análise de um número suficiente de núcleos, os dados são analisados por métodos adequados, para estabelecer os resultados do ensaio.

De notar que se investigou a alteração de diversos aspetos da metodologia, nomeadamente a preparação das amostras, as condições de eletroforese, os parâmetros da análise visual (p. ex., intensidade da mancha e da iluminação do microscópio, utilização de filtros no microscópio e de uma câmara dinâmica) e as condições ambientais (p. ex., a iluminação de fundo), podendo essa alteração afetar a migração do ADN (43) (44) (45) (46).

VERIFICAÇÃO DA PROFICIÊNCIA DO LABORATÓRIO

Cada laboratório deve estabelecer a sua competência experimental no ensaio dos cometas, demonstrando a sua capacidade para obter suspensões de núcleos ou de células isoladas com qualidade suficiente, em relação a cada tecido-alvo de cada espécie utilizada. A qualidade das preparações será avaliada, em primeiro lugar, pela percentagem de ADN de «cauda» no caso dos animais expostos ao veículo incluídos numa gama baixa de reprodutibilidade. Os dados disponíveis indicam que a percentagem média de ADN de «cauda» do grupo (com base na média das medianas — ver ponto 57 para mais pormenores), no caso do fígado de ratazana, não deve, de preferência, exceder 6 %, nível coerente com os valores constantes do ensaio de validação JaCVAM (12) e de outros dados publicados e dados de propriedade industrial. Não há, de momento, dados suficientes para elaborar recomendações sobre gamas melhores ou aceitáveis para outros tecidos — o que não impede a utilização de outros tecidos, se tal se justificar. O relatório do ensaio deve incluir uma análise adequada do desempenho do ensaio dos cometas nesses tecidos relativamente às descrições da bibliografia já publicada ou a dados de propriedade industrial. Em primeiro lugar, é conveniente obter uma gama baixa de percentagem de ADN de «cauda» nos controlos para detetar um efeito positivo. Em segundo lugar, cada laboratório deve ser capaz de reproduzir as respostas esperadas para os mutagénios e pro-mutagénios diretos com diferentes modos de ação, como sugerido no quadro 1 (ponto 29).

Se pertinente, as substâncias positivas podem ser selecionadas, por exemplo, com base no ensaio de validação JaCVAM (12) ou em outros dados publicados (ver ponto 9), de forma devidamente justificada, demonstrando a ocorrência de respostas inequivocamente positivas nos tecidos de interesse. Deve também demonstrar-se a capacidade para detetar efeitos fracos de mutagénios conhecidos, como EMS em doses baixas: por exemplo, estabelecendo relações dose-resposta com números e espaçamentos adequados para as doses. Os esforços devem começar por se concentrar no estabelecimento da competência em relação aos tecidos mais comumente utilizados, como o fígado de roedores, para os quais é possível efetuar comparações com os dados existentes e os resultados previstos (12). É possível recolher, em simultâneo, dados respeitantes a outros tecidos, como o estômago, o duodeno, o jejuno, o sangue, etc. O laboratório tem de demonstrar proficiência em relação a cada tecido de cada espécie que tencione estudar, bem como a possibilidade de obter, nesse tecido, uma resposta positiva aceitável a um agente mutagénico conhecido (por exemplo, EMS).

Devem recolher-se dados para o veículo e o controlo negativo, por forma a demonstrar a reprodutibilidade dos dados respeitantes às respostas negativas e a garantir que os aspetos técnicos do ensaio foram objeto de um controlo adequado ou sugerir a necessidade de restabelecer gamas históricas para os controlos (ver ponto 22).

De notar que, embora na autópsia se possam colher vários tecidos para processamento por análise pelo método dos cometas, o laboratório deve ser competente na colheita de vários tecidos de um só animal, garantindo assim que não é negligenciada nenhuma eventual lesão do ADN e que a análise não é posta em causa. O período decorrido entre a eutanásia e a remoção dos tecidos para processamento pode ser crítico (ver ponto 44).

O bem-estar dos animais deve ser tido em conta no presente ensaio de competência, pelo que o mesmo pode recorrer a tecidos animais utilizados em outros ensaios para a aquisição de competências nos seus diversos aspetos. Além disso, pode não ser necessário um estudo completo durante as fases de estabelecimento de um novo método de ensaio em laboratório, o que permitirá utilizar um menor número de animais ou de concentrações de ensaio para estabelecer as competências necessárias.

Dados históricos de controlo

No decurso das investigações de competência, o laboratório deve construir uma base de dados históricos com vista a estabelecer gamas e distribuições de controlos positivos e negativos para tecidos e espécies relevantes. A bibliografia (47) contém recomendações sobre o modo de obter e utilizar os dados históricos (critérios de inclusão e exclusão de dados em séries históricas e critérios de aceitação para um determinado ensaio). Diferentes tecidos e espécies, bem como diferentes veículos e vias de administração, podem originar diferentes valores percentuais de ADN de «cauda» nos controlos negativos. Importa, pois, estabelecer gamas de controlo negativo para cada tecido e cada espécie. Os laboratórios devem utilizar métodos de controlo de qualidade, como gráficos de controlo (p. ex., gráficos C ou gráficos de barras (48)), para identificar a variabilidade dos seus dados e demonstrar que, no laboratório em causa, a metodologia está sob controlo. A seleção das substâncias de controlo positivo adequadas, das gamas de doses e das condições experimentais (p. ex., condições de eletroforese) pode também ter de ser otimizada para a deteção de efeitos fracos (ver ponto 17).

Quaisquer alterações do protocolo experimental devem ser ponderadas em função da sua coerência com as bases de dados históricos de controlo do laboratório. As incoerências de monta devem conduzir à constituição de uma nova base de dados históricos de controlo.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparações

Escolha da espécie animal

Utilizam-se normalmente estirpes laboratoriais comuns de roedores adultos, jovens e saudáveis, com 6-10 semanas de idade no início do ensaio, embora sejam aceitáveis animais ligeiramente mais velhos. A escolha das espécies de roedores deve ter por base: i) espécies utilizadas em outros estudos de toxicidade (possibilidade de estabelecer uma correlação entre os dados e de realizar estudos integrados); ii) espécies que desenvolveram tumores num estudo de carcinogenicidade, quando se investiga o mecanismo da carcinogénese; ou iii) espécies com o metabolismo mais próximo do humano, se conhecido. No presente ensaio, utilizam-se normalmente ratos. No entanto, podem utilizar-se outras espécies, caso tal se justifique dos pontos de vista científico e ético.

Condições de alojamento e de alimentação dos animais

No caso dos roedores, a temperatura ideal do biotério experimental é de 22 °C (± 3 °C). A humidade relativa ideal é de 50-60 %, com um mínimo de 30 % e um máximo de 70 %, exceto durante a lavagem do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz e 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 pela alimentação, a escolha da dieta poderá ser condicionada pela necessidade de assegurar a dosagem adequada. Os roedores devem ser mantidos em pequenos grupos (em geral, não mais do que cinco) do mesmo sexo, se não for previsível um comportamento agressivo. Os animais só podem ser alojados individualmente se tal se justificar do ponto de vista científico. Devem utilizar-se, sempre que possível, pavimentos sólidos, dado que os pavimentos reticulados podem causar ferimentos graves (49). Deve proporcionar-se um enriquecimento ambiental adequado.

Preparação dos animais

Distribuem-se aleatoriamente os animais pelos grupos de controlo e pelos grupos de exposição. Os animais são identificados de forma inequívoca e aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias antes de se iniciar o ensaio. Deve utilizar-se o método menos invasivo que permita identificar os animais de forma inequívoca. Os meios adequados incluem a colocação de anilhas, marcações ou *microchips* e a identificação biométrica. Os entalhes de orelhas e a amputação de falanges não se justificam cientificamente nestes ensaios. As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder $\pm 20\%$ do peso médio de cada sexo.

Preparação das doses

Os produtos químicos em estudo no estado sólido devem ser dissolvidos ou suspensos em veículos adequados ou misturados na dieta ou na água potável, antes da dosagem dos animais. Os produtos químicos em estudo no estado líquido podem ser adicionados diretamente aos sistemas em estudo e/ou diluídos, antes da dosagem. Para exposições por inalação, os produtos químicos em estudo podem ser administrados sob a forma de gás, vapor ou aerossol sólido/líquido, dependendo das respetivas propriedades físico-químicas (50) (51).

Devem utilizar-se preparações frescas do produto químico em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o mesmo pode ser armazenado e determinem as condições de armazenagem adequadas.

Condições de ensaio

Veículo

O veículo não deve produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas nem reagir com os produtos químicos em estudo. Caso se utilizem veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade em relação aos animais de ensaio, à via de administração e ao parâmetro pretendido. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente/veículo aquoso. De referir que alguns veículos (em especial os veículos viscosos) podem provocar reação inflamatória e aumentar os níveis de base de quebras de cadeias de ADN no ponto de contacto, nomeadamente em caso de administrações múltiplas.

Grupos de controlo

Amostras de controlo positivas

Nesta fase, cada ensaio deve, normalmente, ser efetuado com um grupo constituído por, no mínimo, 3 animais analisáveis de um sexo ou (se se utilizarem ambos os sexos) de cada sexo (ver ponto 32), expostos a uma substância de controlo positivo. No futuro, poderá ser possível demonstrar competência adequada para reduzir a necessidade de controlos positivos. Se se utilizarem tempos de amostragem múltiplos (p. ex., com um único protocolo de administração), apenas é necessário incluir os controlos positivos num dos tempos de amostragem, devendo, porém, assegurar-se uma conceção equilibrada (ver ponto 48). Não é necessário administrar substâncias de controlo positivo em paralelo pela mesma via que o produto químico em estudo, embora seja importante utilizar essa via na determinação de efeitos nos tecidos de contacto. Deve comprovar-se que as substâncias de controlo positivo induzem quebras de cadeias de ADN em todos os tecidos de interesse para a substância química em estudo, sendo o EMS suscetível de ser o controlo positivo escolhido, dado produzir quebras de cadeias de ADN em todos os tecidos já estudados. As doses das substâncias de controlo positivo devem ser escolhidas de modo a produzir efeitos moderados para a avaliação crítica do desempenho e da sensibilidade do ensaio, podendo basear-se em curvas dose-resposta estabelecidas pelo laboratório durante a demonstração de competência. A percentagem de ADN de «cauda» registada nos animais do controlo positivo realizado em paralelo deve ser coerente com a gama laboratorial pré-estabelecida para cada tecido e cada tempo de amostragem, no respeitante a essa espécie (ver ponto 16). O quadro 1 inclui exemplos de substâncias de controlo positivo e de alguns dos respetivos tecidos-alvo em roedores. Podem utilizar-se substâncias que não constem do quadro 1, caso tal se justifique cientificamente.

Quadro 1

Exemplos de substâncias de controlo positivo e de alguns dos respetivos tecidos-alvo

Substâncias e n.º CAS RN
Metanossulfonato de etilo (CAS RN 62-50-0), para todos os tecidos
Etilnitrosureia (CAS RN 759-73-9), para o fígado e o estômago, o duodeno ou o jejuno
Metanossulfonato de metilo (CAS RN 66-27-3), para o fígado, o estômago, o duodeno ou o jejuno, os pulmões e as células de lavagem broncoalveolar, os rins, a bexiga, os testículos, o pulmão e a medula/o sangue
N-Metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (CAS RN: 70-25-7) para o estômago, o duodeno ou o jejuno
1,2-Dimetil-hidrazina.2HCl (CAS RN 306-37-6), para o fígado e o intestino
N-metil-N-nitrosourea (CAS RN 684-93-5), para o sangue, a medula óssea, o fígado, os rins, o estômago, o jejuno e o cérebro.

Controlos negativos

Em cada ensaio, para cada tempo de amostragem e tecido, deve utilizar-se um grupo de animais de controlo negativo, tratados apenas com veículo e, em todos os outros aspetos, tratados do mesmo modo que os grupos de exposição. A percentagem de ADN de «cauda» registada nos animais do controlo negativo deve situar-se na gama laboratorial de base pré-estabelecida para cada tecido e cada tempo de amostragem, no respeitante a essa espécie (ver ponto 16). Na ausência de dados de controlo históricos ou publicados que demonstrem que o veículo escolhido, o número de administrações ou a via de administração não induzem nenhum efeito prejudicial ou genotóxico, devem realizar-se, antes do ensaio completo, estudos preliminares com vista a estabelecer a aceitabilidade do controlo do veículo.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Número e sexo dos animais

Embora, no respeitante ao ensaio dos cometas, haja poucos dados sobre animais do sexo feminino que permitam a comparação entre os sexos, em geral, outras respostas de genotoxicidade *in vivo* são semelhantes entre machos e fêmeas, pelo que os estudos podem ser realizados, na sua maioria, com ambos os sexos. Dados reveladores de diferenças significativas entre machos e fêmeas (p. ex., diferenças de toxicidade sistémica, de metabolismo, de biodisponibilidade, etc., designadamente em estudos exploratórios de gamas de dosagem) aconselham a utilização de ambos os sexos. Neste caso, poderá ser adequado um estudo com ambos os sexos: p. ex., no contexto de um estudo de toxicidade de dose repetida. Pode justificar-se o recurso ao modelo fatorial, caso se utilizem animais de ambos os sexos. O apêndice 2 apresenta pormenores sobre a análise dos dados por recurso a este modelo.

A dimensão dos grupos no início do estudo, bem como durante o estabelecimento da competência, deve permitir dispor de um mínimo de 5 animais analisáveis do mesmo sexo por grupo ou, se forem utilizados ambos os sexos, de um mínimo de 5 animais analisáveis de cada sexo por grupo (menos no grupo de controlo positivo em paralelo — ver ponto 29). Nos casos em que a exposição humana aos produtos químicos possa ser específica para cada sexo, como acontece com alguns produtos farmacêuticos, o ensaio deve ser executado com animais do sexo em causa. A título de orientação, o número máximo de animais necessário num estudo realizado de acordo com os parâmetros estabelecidos no ponto 33, com três grupos de dosagem e, em paralelo, um grupo de controlo negativo e um grupo de controlo positivo (cada um deles constituído por cinco animais do mesmo sexo), será normalmente de 25 a 35.

PROGRAMAÇÃO DO ENSAIO

Os animais devem ser diariamente expostos ao produto químico em estudo, por um período de 2 ou mais dias (duas ou mais exposições com intervalos aproximados de 24 horas), devendo a primeira amostra ser colhida 2 a 6 h (ou a T_{max}) após a última exposição (12). São aceitáveis amostras colhidas na sequência de regimes de administração prolongada (p. ex., dose diária durante 28 dias). Foi demonstrada a possibilidade de combinar com êxito o ensaio dos cometas com o ensaio dos micronúcleos de eritrócitos (10) (19). No entanto, deve conferir-se especial atenção à logística envolvida na amostragem de tecidos para análise pelo método dos cometas, bem como aos requisitos de amostragem de tecidos para outros tipos de avaliações toxicológicas. A colheita 24 horas após a administração da última dose, que é característica de um estudo de toxicidade geral, não é adequada na maioria dos casos (ver ponto 40 no respeitante ao tempo de amostragem). Deve justificar-se o recurso a outros calendários de tratamento e amostragem (ver apêndice 3). Poderia, por exemplo, efetuar-se uma exposição única com amostragem múltipla; contudo, os estudos com uma única administração recorrem a mais animais, devido à necessidade de utilizar tempos de amostragem múltiplos, embora, por vezes, possam ser preferíveis, nomeadamente se o produto químico em estudo produzir toxicidade excessiva na sequência de administrações repetidas.

Independentemente da forma como for realizado, o ensaio é aceitável desde que o produto químico em estudo produza um resultado positivo ou, no caso de um ensaio negativo, que sejam apresentadas provas diretas ou indiretas de os tecidos-alvo terem sido expostos ou serem afetados pela toxicidade, ou ainda se a dose-limite for atingida (ver ponto 36).

Para facilitar a administração de grandes volumes, os produtos químicos em estudo também podem ser administrados sob a forma de dose dividida (ou seja, duas exposições no mesmo dia, separadas por não mais de 2 a 3 horas). Nestas condições, o tempo de amostragem deve ser programado em função da última administração (ver ponto 40).

Doses

Se, por não estarem disponíveis dados de outros estudos relevantes que possam servir de orientação na escolha das doses, for realizado previamente um estudo exploratório da gama de dosagens a administrar, este deve ter lugar no mesmo laboratório, utilizando a mesma espécie, a mesma estirpe, o mesmo sexo e o mesmo regime de exposição previstos para o estudo principal, de acordo com as abordagens correntemente utilizadas para a realização desses estudos. O estudo deve ter por objetivo identificar a dose máxima tolerável (DMT), definida como a dose que, durante o período de ensaio, produz efeitos ligeiramente tóxicos (por exemplo, sinais clínicos claros, como comportamentos ou reações anormais, uma ligeira redução do peso corporal ou citotoxicidade nos tecidos-alvo), mas não a morte ou sinais de dor, sofrimento ou stress que impliquem eutanásia. No caso da administração de produtos químicos em estudo não tóxicos por um período de 14 ou mais dias, a dose máxima (dose-limite) é de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia. Se o período de administração for inferior a 14 dias, a dose máxima (dose-limite) é de 2 000 mg/kg de peso corporal/dia. Estes limites podem variar para certos tipos de produtos químicos em estudo abrangidos por regulamentações específicas (p. ex., medicamentos para uso humano).

Os produtos químicos que exibam saturação das suas propriedades toxicocinéticas ou que induzam processos de desintoxicação passíveis de se traduzirem numa diminuição da exposição após administração prolongada podem constituir exceção aos critérios de fixação das doses, devendo ser avaliados caso a caso.

Tanto na versão aguda como na versão subaguda do ensaio dos cometas, além da dose máxima (MTD, dose máxima possível, exposição máxima ou dose-limite), deve selecionar-se, para cada tempo de amostragem, uma sequência decrescente de, pelo menos, duas doses adicionais, espaçadas de forma adequada (de preferência, separadas por um fator inferior a 10), a fim de demonstrar eventuais relações dose-efeito. Contudo, as doses utilizadas devem, de preferência, abarcar uma gama que vá da toxicidade máxima até uma toxicidade reduzida ou nula. Caso se observe toxicidade no tecido-alvo a todas as doses ensaiadas, recomenda-se a realização de um estudo complementar com doses não-tóxicas (ver pontos 54-55). Os estudos destinados a investigar de modo mais preciso a forma da curva dose-resposta podem exigir outras gamas de doses.

Administração das doses

Na conceção de um ensaio, deve ter-se em mente a via prevista de exposição humana. Por conseguinte, podem escolher-se, com justificação, vias de exposição como a alimentação, a água de beber, as vias subcutânea tópica, intravenosa e oral (por sonda gástrica), a inalação, a via intratraqueal ou os implantes. Em qualquer caso, a via escolhida deve garantir a exposição adequada do(s) tecido(s)-alvo. A injeção intraperitoneal não é, em geral, recomendada, uma vez que não se trata de uma via previsível de exposição humana, só devendo ser utilizada com justificação científica específica (p. ex., no caso de determinadas substâncias de controlo positivo, para fins de investigação, ou de alguns medicamentos administrados por via intraperitoneal). O volume máximo de líquido que pode ser administrado por gavagem ou injeção numa toma depende do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 1 ml/100 g de peso corporal, com exceção das soluções aquosas, que podem utilizar-se na proporção de 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes maiores (se permitida pela legislação no domínio do bem-estar dos animais) deve ser justificada. Sempre que possível, as diversas doses devem ser obtidas por ajustamento da concentração da formulação de dosagem, de modo a assegurar um volume constante em relação ao peso corporal em todas as dosagens.

Tempo de amostragem

O tempo de amostragem constitui uma variável crucial, uma vez que é determinado pelo período necessário para que os produtos químicos em estudo atinjam a concentração máxima no tecido-alvo e para que sejam induzidas quebras de cadeias de ADN, antes de essas quebras serem removidas ou reparadas ou provocarem a morte da célula. A persistência de algumas das lesões que levam à quebra de cadeias de ADN detetadas pelo ensaio dos cometas pode ser muito reduzida, pelo menos no que respeita a alguns produtos químicos sujeitos a ensaio *in vitro* (52) (53). Neste contexto, se se suspeitar da ocorrência de tais lesões do ADN, devem tomar-se medidas para atenuar as suas consequências, assegurando uma amostragem suficientemente precoce dos tecidos, se possível antes dos tempos por defeito abaixo indicados. A otimização do(s) tempo(s) de amostragem pode depender do produto químico ou de uma via específica, como a exposição rápida dos tecidos por administração intravenosa ou por inalação. Por conseguinte, sempre que possível, os tempos de amostragem devem ser determinados com base em dados cinéticos (p. ex., o instante — T_{max} — em que é atingido o pico de concentração — C_{max} — no plasma ou nos tecidos, ou o estado estacionário, em caso de várias administrações). Na ausência de dados cinéticos, um compromisso adequado para a medição da genotoxicidade consiste em colher a amostra 2 a 6 horas após a última exposição, no caso de duas ou mais exposições, ou 2 a 6 e 16 a 26 horas após uma única administração, tendo o cuidado de autopsiar todos os animais decorrido o mesmo tempo após a administração da última (ou única) dose. Podem também utilizar-se eventuais informações disponíveis sobre o surgimento de efeitos tóxicos em órgãos-alvo, para seleccionar os tempos de amostragem adequados.

Exames

Os animais devem ser sujeitos a observações clínicas gerais pelo menos uma vez por dia, de preferência à(s) mesma(s) hora(s) todos os dias e tendo em conta o período de pico de efeitos antecipados após a administração da dose (54); os resultados dessas observações devem ser registados. Pelo menos duas vezes por dia, todos os animais devem ser observados para a deteção de sinais de morbilidade e mortalidade. Em estudos com duração mais longa, todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana, bem como no final do período de ensaio. O consumo de alimentos deve ser medido em cada renovação dos mesmos e, pelo menos, uma vez por semana. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, o consumo desta deve ser medido em cada mudança de água e, pelo menos, uma vez por semana. Os animais que apresentem indicadores de toxicidade excessiva não letal devem ser eutanasiados antes do termo do período de ensaio; os dados que lhes dizem respeito não se utilizam, geralmente, na análise pelo método dos cometas.

Colheita de tecidos

Uma vez que é possível estudar a indução de quebra de cadeias de ADN («cometas») em praticamente qualquer tecido, o fundamento para a seleção do(s) tecido(s) a colher deve ser claramente definido e basear-se no motivo para a realização do estudo, bem como em quaisquer dados de absorção, distribuição, metabolismo, excreção, genotoxicidade, carcinogenicidade ou outros dados de toxicidade relativos aos produtos químicos em estudo. Nos fatores importantes a considerar devem incluir-se a via de administração [com base na(s) via(s) de exposição humana provável(is)], as previstas distribuição e absorção no tecido, o papel do metabolismo e o possível mecanismo de ação dos produtos químicos em estudo. O fígado tem sido o tecido mais frequentemente estudado e para o qual

existem mais dados. Por conseguinte, na ausência de informações retrospectivas e sem a identificação de determinados tecidos específicos de interesse, justifica-se a colheita de amostras de fígado, dado constituir a localização principal do metabolismo xenobiótico e registar, com frequência, uma elevada exposição quer a substância(s)-mãe quer a metabolito(s). Em alguns casos, pode revelar-se mais curial a análise de um local de contacto direto (p. ex., no caso dos produtos químicos administrados por via oral, o estômago glandular, o duodeno ou o jejuno, ou, no caso dos produtos químicos administrados por inalação, os pulmões). Os tecidos adicionais ou alternativos devem ser selecionados com base nos motivos específicos que levam à realização do ensaio; a sua utilização pode ser útil em caso de análise de vários tecidos dos mesmos animais, desde que o laboratório tenha demonstrado aptidão com esses tecidos e competência na manipulação de vários tecidos múltiplos em simultâneo.

Preparação das amostras

Para os processos descritos nos pontos que se seguem (44-49), importa que todas as soluções ou suspensões estáveis sejam utilizadas dentro do seu prazo de validade, sem o que devem ser preparadas de novo. Nos pontos que se seguem, consideram-se também, como variáveis críticas, o tempo necessário para: i) eliminar cada tecido após a autópsia; ii) processar cada tecido para obter suspensões de células/núcleos; iii) processar a suspensão e preparar as lâminas (ver definições, apêndice 1); a duração aceitável dos períodos em causa para cada uma destas etapas deve ter sido determinada nas fases de estabelecimento do método e de demonstração de competência.

Os animais são eutanasiados no momento oportuno após a última exposição ao produto químico em estudo, respeitando a legislação em matéria de bem-estar dos animais e o princípio dos 3R. Os tecidos selecionados são removidos e dissecados, recolhendo-se uma porção para o ensaio dos cometas; simultaneamente, uma secção da mesma parte do tecido é cortada e colocada numa solução de formaldeído ou de um fixador adequado, para eventual exame histopatológico (ver ponto 55) por métodos normalizados (12). O tecido para o ensaio dos cometas é colocado num tampão de picagem, lavado suficientemente com o mesmo tampão a frio, para remover o sangue residual, e armazenado em tampão de picagem gelado até ao processamento. Pode também efetuar-se a perfusão *in situ*, p. ex., no caso do fígado ou dos rins.

Há um grande número de métodos publicados para o isolamento de células/núcleos. Estes métodos incluem a trituração de tecidos como o fígado ou o rim, a raspagem de superfícies de mucosas, no caso do trato gastrointestinal, a homogeneização e a digestão enzimática. O ensaio de validação JaCVAM estudou apenas células isoladas, pelo que, no respeitante ao estabelecimento do método e à possibilidade de remeter para os dados do ensaio JaCVAM para a demonstração de competência, são preferíveis as células isoladas. Verificou-se, contudo, que não há diferenças essenciais no resultado do ensaio quer se utilizem células isoladas ou núcleos isolados (8). Diversos métodos de isolamento de células ou núcleos (p. ex., homogeneização, trituração, digestão enzimática, filtração com crivo) fornecem resultados comparáveis (55). Por conseguinte, podem utilizar-se células isoladas ou núcleos isolados. Os laboratórios devem avaliar exaustivamente e validar métodos específicos dos tecidos para o isolamento de células/núcleos. Como referido no ponto 40, pode ser muito reduzida a persistência de algumas das lesões que levem à quebra de cadeias de ADN detetadas pelo ensaio dos cometas (52) (53). Assim, independentemente do método utilizado para preparar as suspensões de células ou núcleos, importa que os tecidos sejam processados o mais rapidamente possível depois de os animais serem eutanasiados e colocados em condições que dificultem a reparação de lesões (p. ex., mantendo o tecido a baixas temperaturas). As suspensões de células devem ser mantidas geladas até estarem prontas para utilização, de modo a proporcionar uma variação mínima interamostras e respostas de controlo positivas e negativas adequadas.

PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

As lâminas devem ser preparadas o mais rapidamente possível (idealmente no prazo de uma hora) após a preparação das células ou núcleos; a temperatura e o tempo decorrido entre a morte dos animais e a preparação das lâminas devem ser objeto de um controlo rigoroso e de validação em conformidade com as condições do laboratório. O volume da suspensão de células adicionado a agarose de baixo ponto de fusão (normalmente 0,5-1,0 %) na preparação das lâminas não deve reduzir a percentagem de agarose para menos de 0,45 %. A densidade celular ótima será determinada pelo sistema de análise das imagens utilizado para a contagem dos «cometas»

Lise

As condições de lise também são variáveis críticas e podem interferir com as quebras resultantes de determinados tipos específicos de modificações do ADN (certas alquilações e adições às bases). Recomenda-se, pois, que, para todas as lâminas de cada ensaio, se mantenham as condições de lise a níveis tão constantes quanto possível. Uma vez preparadas, as lâminas devem ser imersas numa solução de lise refrigerada durante, pelo menos, uma hora (ou de um dia para o outro) a cerca de 2-8 °C, com iluminação difusa (p. ex., luz amarela) ou ao abrigo da luz, de modo a evitar a exposição à luz branca, que pode conter componentes UV. Após este período de incubação, as lâminas são lavadas, para remover resíduos de detergentes e sais, antes da etapa de desenrolamento com álcali. Para tal, pode utilizar-se água purificada, tampão de neutralização ou tampão de fosfatos. Pode também utilizar-se tampão de eletroforese, o que permite manter a câmara de eletroforese em condições alcalinas.

Desenrolamento e eletroforese

As lâminas devem ser dispostas de forma aleatória na placa de uma unidade de eletroforese de imersão, com uma quantidade de solução suficiente para cobrir totalmente a superfície das lâminas (a profundidade desta cobertura deve ser constante nas várias séries experimentais). Com unidades de eletroforese de outro tipo (p. ex. com refrigeração ativa, circulação e tensão elevada), uma maior profundidade da solução de cobertura traduzir-se-á num aumento da intensidade da corrente, a tensão constante. Deve utilizar-se uma conceção equilibrada para colocar as lâminas na tina de eletroforese, com vista a atenuar os efeitos de eventuais tendências ou efeitos de borda no interior da tina; para minimizar a variabilidade entre lotes, ou seja, entre séries experimentais, deve utilizar-se o mesmo número de lâminas de cada animal no estudo e incluir-se amostras dos diversos grupos de doseamento e dos controlos (negativos e positivos). As lâminas devem ser mantidas durante, pelo menos, 20 minutos para o desenrolamento do ADN e, em seguida, submetidas a eletroforese em condições controladas que permitam maximizar a sensibilidade e a gama dinâmica do ensaio (isto é, conduzir a níveis percentuais aceitáveis de ADN de «cauda» nos controlos positivos e negativos, de forma a maximizar a sensibilidade). O nível de migração de ADN apresenta uma relação linear com a duração da eletroforese, bem como com o potencial (V/cm). Com base nos dados do ensaio JaCVAM, o valor deste último poderá ser de 0,7 V/cm durante, pelo menos, 20 minutos. A duração da eletroforese é considerada uma variável crítica, devendo a sua duração ser fixada, para otimizar a gama dinâmica. Os períodos de eletroforese mais longos (p. ex., 30 a 40 minutos, para maximizar a sensibilidade) produzem, em geral, respostas mais positivas com mutagénios conhecidos. No entanto, podem também conduzir a uma migração excessiva nas amostras de controlo. Em cada ensaio, a tensão deve ser mantida constante e a variabilidade dos outros parâmetros deve situar-se numa gama estreita e específica (p. ex., no ensaio JaCVAM, 0,7 V/cm produzem uma corrente inicial de 300 mA). A profundidade do tampão deve ser ajustada para se obterem as condições necessárias, a manter durante todo o ensaio. Deve registar-se a intensidade da corrente no início e no final da eletroforese. Importa, pois, determinar as condições ideais para cada tecido no contexto da primeira demonstração de competência no laboratório em causa. A temperatura da solução de eletroforese durante o desenrolamento e a eletroforese deve ser mantida a níveis baixos, geralmente da ordem de 2-10 °C (10). Deve registar-se a temperatura da solução de eletroforese no início do desenrolamento, no início da eletroforese e no final desta.

Após a conclusão da eletroforese, as lâminas devem ser imersas ou enxaguadas no tampão de neutralização durante, pelo menos, 5 minutos. Os géis podem ser coloridos e examinados a curto prazo (p. ex., 1-2 dias) ou desidratados para avaliação posterior (p. ex., 1-2 semanas após a coloração) (56). No entanto, as condições devem ser validadas durante a demonstração de competência, devendo os dados históricos ser obtidos e conservados separadamente para cada uma dessas condições. No último caso, as lâminas devem ser desidratadas por imersão em etanol absoluto durante, pelo menos, 5 minutos, secadas ao ar e, em seguida, armazenadas à temperatura ambiente ou num recipiente no frigorífico, até ao exame.

Métodos de medição

Os «cometas» devem ser avaliados quantitativamente por recurso a um sistema automático ou semiautomático de análise de imagens. As lâminas são coradas com um corante fluorescente adequado, como SYBR Gold, Green I, iodeto de propídio ou brometo de etídio, e observadas com uma ampliação adequada (p. ex., 200x) num microscópio equipado para epifluorescência e com detetores adequados, ou uma câmara digital (p. ex., CDD).

As células podem ser classificadas em três categorias — como descrito no atlas de imagens (57) — a saber: mensurável, não mensurável e «ouriço» (ver ponto 56 para mais pormenores). A fim de evitar perturbações, apenas as células mensuráveis (cabeça e cauda claramente definidas, sem qualquer interferência com as células vizinhas) devem ser analisadas para a determinação da percentagem de ADN de «cauda». Não é necessário referir a frequência de células não mensuráveis. Dada a ausência de uma «cabeça» bem definida significar que as células «ouriços» não são facilmente detetadas por análise das imagens, a frequência dessas células deve ser determinada com base no exame visual de, pelo menos, 150 células por amostra (ver ponto 56 para mais pormenores) e documentada separadamente.

Todas as lâminas para análise, incluindo as dos controlos positivos e negativos, devem ser codificadas independentemente e avaliadas de forma «cega» para que o operador não conheça o tipo de tratamento efetuado. Para cada amostra (por tecido e por animal), devem analisar-se, pelo menos, 150 células (excluindo os «ouriços» — ver ponto 56). O exame de 150 células por animal com, pelo menos, 5 animais por dose (exceto no controlo positivo em paralelo — ver ponto 29) proporciona uma representatividade estatística adequada, de acordo com a análise realizada por Smith *et al* em 2008 (5). Caso se recorra a lâminas, poderão examinar-se 2 ou 3 lâminas por amostra, se se utilizarem 5 animais por grupo. Devem examinar-se várias zonas da lâmina a uma densidade à qual não se registre sobreposição das caudas. Deve evitar-se examinar a borda das lâminas.

No ensaio dos cometas, as quebras de cadeias de ADN podem ser avaliadas com base em parâmetros independentes, como a percentagem de ADN de «cauda» o seu comprimento e o momento. Podem efetuar-se as três medições se se utilizar um *software* adequado de análise de imagens. Recomenda-se, contudo, utilizar a percentagem de ADN de «cauda» (também conhecida por percentagem de intensidade da «cauda») para a avaliação e a interpretação dos resultados (12) (40) (41) (42); essa percentagem é determinada pela intensidade de fragmentos de ADN na «cauda» expressa em percentagem da intensidade celular total (13).

Lesão de tecidos e citotoxicidade

A obtenção de resultados positivos no ensaio dos cometas pode não se dever exclusivamente à genotoxicidade; a toxicidade no tecido-alvo poderá também resultar num aumento da migração do ADN (12) (41). Reciprocamente, uma citotoxicidade baixa ou moderada é muitas vezes associada a genotoxinas conhecidas (12), demonstrando a impossibilidade de distinguir entre a migração de ADN induzida pela genotoxicidade e a migração induzida pela citotoxicidade, no contexto exclusivo de um ensaio dos cometas. Todavia, se se observar um aumento da migração de ADN, recomenda-se o exame de um ou mais indicadores de citotoxicidade, que poderá contribuir para a interpretação dos resultados. O aumento da migração de ADN na presença de indícios evidentes de citotoxicidade deve ser interpretado com prudência.

Propuseram-se muitas medidas da citotoxicidade, entre as quais as alterações histopatológicas são consideradas uma medida relevante de toxicidade nos tecidos. Observações como a inflamação, a infiltração de células ou as alterações apoptóticas ou necróticas foram associadas a aumentos na migração do ADN; no entanto, o ensaio de validação JaCVAM demonstrou não existir nenhuma lista definitiva de alterações histopatológicas sistematicamente associável ao aumento da migração de ADN (12). As alterações de parâmetros do domínio da química clínica (p. ex., AST, ALT) podem também fornecer informações úteis sobre as lesões de tecidos; podem ainda ser tidos em conta outros indicadores, como a ativação da caspase, a coloração TUNEL, a coloração com Annexin V, etc. Há, porém, poucos dados publicados sobre a utilização destes últimos em estudos *in vivo*, alguns dos quais podem ser menos fiáveis do que outros.

Os «ouriços» (também chamados «nuvens» ou células-fantasma) são células cuja imagem ao microscópio é constituída por uma «cabeça» pequena ou inexistente e «caudas» grandes e difusas, sendo consideradas células muito danificadas, embora de etiologia incerta (ver apêndice 3). Devido à aparência destas células, as medições de percentagens de ADN de «cauda» por análise de imagens não são fiáveis, pelo que os «ouriços» devem ser avaliados separadamente. A ocorrência de «ouriços» deve ser registada e comunicada; deve investigar-se e interpretar-se com cuidado qualquer aumento apreciável dessa ocorrência que se possa atribuir ao produto químico em estudo. O conhecimento do modo de ação potencial dos produtos químicos em estudo pode ser útil neste contexto.

RESULTADOS E RELATÓRIO

Tratamento dos resultados

A unidade experimental é o animal, pelo que os dados respeitantes a cada um, juntamente com uma síntese dos resultados, devem ser apresentados sob a forma de um quadro. Devido à natureza hierárquica dos dados, recomenda-se a determinação da mediana da percentagem de ADN de «cauda» para cada lâmina e o cálculo da média dos valores das medianas para cada animal (12). Determina-se em seguida a média das médias respeitantes a cada animal, para se obter uma média de grupo. Todos estes valores devem ser incluídos no relatório. Podem utilizar-se abordagens alternativas (ver ponto 53) caso tal se justifique dos pontos de vista científico e estatístico. A análise estatística pode ser feita por recurso a várias abordagens (58) (59) (60) (61). Na seleção dos métodos estatísticos a utilizar, deve ponderar-se, em conformidade com as referências bibliográficas *supra*, a necessidade de transformação dos dados (p. ex., logarítmica ou por raiz quadrada) e/ou da adição de um pequeno número (p. ex., 0,001) a todos os valores — mesmo superiores a zero — para mitigar os efeitos dos valores celulares nulos. O apêndice 2 contém pormenores sobre a análise do tratamento/das interações entre os sexos quando se utilizam animais de ambos os sexos, bem como sobre a análise subsequente dos dados, quer se observem diferenças quer não. Devem também comunicar-se os resultados da toxicidade em animais e dos sinais clínicos.

Critérios de aceitabilidade

A aceitação do ensaio baseia-se nos seguintes critérios:

- a. um controlo negativo realizado em paralelo é considerado aceitável para inclusão na base de dados históricos de controlo negativo do laboratório, nos termos descritos no ponto 16.
- b. as amostras de controlo positivo (ver ponto 29) devem induzir respostas compatíveis com as incluídas na base de dados históricos de controlo positivo e produzir um aumento estatisticamente significativo relativamente ao controlo negativo em paralelo.
- c. analisaram-se números adequados de células e doses (pontos 52 e 36-38).
- d. os critérios de seleção da dose mais elevada são coerentes com os descritos no ponto 36.

Avaliação e interpretação dos resultados

Caso se cumpram todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo se:

- a. pelo menos uma das doses de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo,
- b. o aumento, avaliado com base numa análise de tendências adequada, é dependente da dose,
- c. há resultados fora da distribuição dos dados históricos do controlo negativo, para uma dada espécie, veículo, via, tecido ou número de administrações.

Se se preencherem todos estes critérios, o produto químico em estudo é considerado passível de induzir quebras de cadeias de ADN nos tecidos estudados no presente sistema de ensaio. Se só se cumprirem um ou dois destes critérios, ver ponto 62.

Caso se cumpram todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo se:

- a. nenhuma das concentrações de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo,
- b. não se observar nenhum aumento dependente da dose, numa avaliação feita com base numa análise de tendências adequada.
- c. todos os resultados se situarem dentro da distribuição dos dados históricos do controlo negativo, para uma dada espécie, veículo, via, tecido ou número de administrações.
- d. houver indícios comprovados, diretos ou indiretos, de os tecidos-alvo terem sido expostos ou serem afetados pela toxicidade.

O produto químico em estudo não é considerado passível de induzir quebras de cadeias de ADN nos tecidos estudados no presente sistema de ensaio.

Não há nenhuma exigência concreta para a verificação de uma resposta inequivocamente positiva ou negativa.

Se a resposta não for inequivocamente positiva nem negativa (isto é, se não se cumprirem todos os critérios enumerados nos pontos 59 ou 60), e para estabelecer a importância biológica de um resultado, os dados devem ser avaliados por peritos e/ou no âmbito de uma investigação complementar, caso tal se justifique do ponto de vista científico. Neste contexto, pode ser útil a contagem de células adicionais (se adequado) ou a realização de uma nova experiência, eventualmente com otimização das condições experimentais (p. ex., intervalo diferente entre as doses, outras vias de administração, outros tempos de amostragem ou outros tecidos).

Em certos casos, raros, mesmo após estudos complementares, os dados obtidos não permitirão concluir por um resultado positivo ou negativo, pelo que se considerará que o resultado é ambíguo.

Para avaliar o significado biológico de um resultado positivo ou ambíguo, são necessárias informações sobre a citotoxicidade no tecido-alvo (ver pontos 54-55). Se os resultados positivos ou ambíguos ocorrerem apenas em conjunto com provas claras de citotoxicidade, concluir-se-á que o estudo é inconclusivo no respeitante à genotoxicidade, exceto se existirem informações suficientes que apoiem uma conclusão definitiva. Em caso de resultado negativo num contexto de sinais de toxicidade em todas as doses ensaiadas, pode ser aconselhável realizar um estudo complementar com doses não tóxicas.

Relatório do ensaio

Elementos a incluir no relatório de ensaio:

Produto químico em estudo:

- proveniência, número do lote, se disponíveis;
- estabilidade do produto químico em estudo, data-limite de utilização ou data de reanálise, se conhecidas.

Substância monocomponente:

- aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas relevantes;
- dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, se justificado e exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

- caracterização, na medida do possível, da identidade química (ver acima), da ocorrência quantitativa e das propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Solvente/veículo:

- justificação para a escolha do solvente/veículo;
- solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/veículo, se conhecidas;
- preparação das formulações de doses;
- determinações analíticas com essas fórmulas (p. ex.: estabilidade, homogeneidade, concentrações nominais).

Animais utilizados no ensaio:

- espécie/estirpe utilizada; justificações científica e ética da escolha;
- número, idade e sexo;

- proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.;
- peso de cada animal no início e no final do ensaio, incluindo o intervalo de pesos corporais, a média e o desvio-padrão para cada grupo.

Condições de realização do ensaio:

- controlos positivos e negativos (veículo/solvente);
- resultados de um eventual estudo para definição da gama de doses;
- fundamentação da escolha das doses;
- detalhes da preparação do produto químico em estudo;
- elementos relativos à administração do produto químico em estudo;
- justificação da via de administração escolhida;
- local de injeção (estudos com administração subcutânea ou intravenosa);
- métodos de preparação das amostras (se conhecidos) e análises histopatológicas, sobretudo para os produtos químicos com resultado positivo no ensaio dos cometas;
- fundamento da seleção dos tecidos;
- métodos para verificar se o produto químico em estudo atingiu o tecido-alvo ou a circulação geral, caso se obtenham resultados negativos;
- dose real (mg/kg de peso corporal/dia), calculada a partir da concentração do produto químico em estudo nos alimentos ou na água potável (ppm) e do consumo, se aplicável;
- pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água.
- descrição detalhada da exposição e do programa de colheita de amostras e justificação das escolhas feitas (p. ex., eventuais dados toxicocinéticos);
- método de alívio da dor (analgesia);
- método de eutanásia;
- procedimentos para o isolamento e a preservação de tecidos;
- métodos de preparação da suspensão de células/núcleos;
- proveniência e números de lote de todos os reagentes (se possível);
- métodos de avaliação da citotoxicidade;
- condições de eletroforese;
- técnicas de coloração utilizadas;
- métodos de contagem e classificação dos «cometas»

Resultados:

- eventuais observações clínicas de carácter geral, antes e ao longo do período de ensaio, para cada animal;
- provas de citotoxicidade, caso existam;
- para estudos de duração superior a uma semana: peso de cada animal durante o ensaio, incluindo a gama de pesos corporais, a média e o desvio-padrão para cada grupo; consumo de alimentos;

- relação dose-resposta, quando se possa determinar;
- para cada tecido ou cada animal, percentagem de ADN de «cauda» (ou outros parâmetros, se escolhidos); valores medianos por lâmina; valores médios por animal e por grupo;
- dados históricos e simultâneos sobre o controlo negativo, com intervalos, médias/medianas e desvios-padrão, para cada tecido estudado;
- dados relativos ao controlo positivo realizado em paralelo com o ensaio e dados históricos sobre o controlo positivo,
- para todos os tecidos exceto o fígado, curva dose-resposta decorrente do controlo positivo. Para tal, utilizam-se os dados recolhidos durante a demonstração de competência (ver pontos 16-17), devendo justificar-se, com apoio bibliográfico, a adequação da intensidade e da dispersão das respostas aos controlos efetuados com esse tecido;
- análise estatística e respetivo método; critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou inconclusivo;
- frequência de «ouriços» em cada grupo e por animal.

Discussão dos resultados

Conclusões

Referências

REFERÊNCIAS

- 1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.
- 2) Brendler-Schwaab, S. *et al.* (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.
- 3) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- 4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.
- 5) Smith, C.C. *et al.* (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.
- 6) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.
- 7) McKelvey-Martin, V.J. *et al.* (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.
- 8) Tice, R.R. *et al.* (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.
- 9) Singh, N.P. *et al.* (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.
- 10) Rothfuss, A. *et al.* (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.
- 11) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OCDE, Paris.

- 12) OCDE (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- 13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the «Comet» assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.
- 14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.
- 15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.
- 16) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-20.
- 17) Kushwaha, S. *et al.* (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145-54.
- 18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.
- 19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.
- 20) Recio, L. *et al.* (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.
- 21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.
- 22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations**, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.
- 23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.
- 24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.
- 25) Toyozumi, T. *et al.* (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.
- 26) Struwe, M. *et al.* (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.
- 27) Wada, K. *et al.* (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.
- 28) Wang, A. *et al.* (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.

- 29) Burlinson, B. *et al.* (2007), *In Vivo Comet Assay Workgroup*, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- 30) Jackson, P. *et al.* (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.
- 31) Sasaki, Y.F. *et al.* (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.
- 32) Sekihashi, K. *et al.* (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.
- 33) Speit, G., M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity**, *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.
- 34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.
- 35) Cordelli, E. *et al.* (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.
- 36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.
- 37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.
- 38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.
- 39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay**, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.
- 40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), pp. 7-16.
- 41) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- 42) Kumaravel, T.S. *et al.* (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.
- 43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.
- 44) Möller, P. *et al.* (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.
- 45) Forchhammer, L. *et al.* (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.
- 46) Azqueta, A. *et al.* (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.

- 47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
 - 48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, John Wiley and Sons, New York 2nd ed.
 - 49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)
 - 50) Capítulo B.8 do presente anexo: *Toxicidade subaguda por inalação: estudo de 28 dias*.
 - 51) Capítulo B.29 do presente anexo: *Toxicidade subcrónica por inalação: estudo de 90 dias*.
 - 52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.
 - 53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.
 - 54) OCDE (2002), «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation» OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.
 - 55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.
 - 56) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45-51.
 - 57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.
 - 58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.
 - 59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.
 - 60) Bright, J. *et al.* (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.
 - 61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.
-

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Eletroforese em gel de células isoladas, em meio alcalino: Técnica sensível para a deteção de lesões primárias do ADN em células individuais ou núcleos.

Produto químico: Substância ou mistura.

«**Cometa**»: Forma adquirida pelos nucleoides após serem sujeitos a um campo electroforético; a designação deve-se à semelhança com os cometas (a «cabeça» é o núcleo e a «cauda» é constituída pelo ADN que se deslocou para fora do núcleo, por ação do campo elétrico).

Variável crítica/parâmetro crítico: Protocolo variável em cujo contexto uma pequena alteração pode ter grande impacto na conclusão do ensaio. As variáveis críticas podem ser específicas dos tecidos. Não devem ser alteradas, em especial no contexto de um ensaio, sem ter em conta as eventuais consequências da alteração no resultado do ensaio, expressas, p. ex., na amplitude e na variabilidade dos controlos positivos e negativos. O relatório de ensaio deve incluir a lista de alterações das variáveis críticas efetuadas durante o ensaio ou em comparação com o protocolo normalizado aplicado pelo laboratório, com uma justificação para cada alteração.

Intensidade da «cauda» ou percentagem de ADN de «cauda»: Corresponde à intensidade da «cauda» em relação à intensidade do «cometa» total («cabeça» e «cauda»). Reflete a extensão da quebra de ADN, expressa em percentagem.

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

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

*Apêndice 2***MODELO FATORIAL PARA IDENTIFICAR DIFERENÇAS ENTRE SEXOS NO ENSAIO DOS COMETAS IN VIVO****Conceção multifatorial e sua análise**

Este modelo utiliza, no mínimo, 5 machos e 5 fêmeas para cada concentração, totalizando, no mínimo, 40 animais (20 machos e 20 fêmeas, além dos controlos positivos pertinentes).

O modelo, que constitui uma das concepções multifatoriais mais simples, equivale a uma análise de variância bidirecional, em que o sexo e a concentração são os principais efeitos. Os dados podem ser analisados por vários pacotes normalizados de *software* estatístico, como SPSS, SAS, STATA e Genstat, bem como por recurso ao parâmetro R.

A análise discrimina, no conjunto de dados, a variabilidade entre os sexos, a variabilidade entre as concentrações e a variabilidade ligada à interação entre os sexos e as concentrações. Cada um dos termos é testado em função da variabilidade entre os animais replicados nos grupos do mesmo sexo, para a mesma concentração. Estão disponíveis em muitos manuais de estatística (ver referências), bem como na função «ajuda» dos pacotes estatísticos, dados pormenorizados relativos à metodologia em causa.

A análise consiste em confrontar o termo da interação sexo-concentração no quadro ANOVA ⁽¹⁾. Na ausência de um termo de interação significativo, os valores combinados entre os sexos ou as concentrações proporcionam provas estatísticas válidas entre as concentrações, com base nas que são agrupadas no termo de variabilidade dos grupos ANOVA.

A análise prossegue repartindo a estimativa da variabilidade entre as concentrações por contrastes, o que proporciona uma melhor abordagem dos contrastes lineares e quadráticos das respostas às concentrações. Quando existe uma interação significativa sexo-concentração, este termo pode igualmente ser cindido no contraste de interação linear em função do sexo e no contraste de interação quadrática em função do sexo. Ambos os termos em causa permitem determinar se as respostas às concentrações são paralelas para ambos os sexos ou se há resposta diferencial entre estes.

A estimativa do agrupamento no contexto da variabilidade do grupo pode ser utilizada como teste par-a-par da diferença entre as médias. As comparações podem ser feitas entre as médias para ambos os sexos e as médias para a concentração diferente, bem como entre as concentrações do controlo negativo. Caso haja uma interação significativa, podem fazer-se comparações entre as médias de várias concentrações, com um só sexo, ou entre as médias dos sexos para a mesma concentração.

REFERÊNCIAS

Muitos manuais de estatística abordam a teoria, a conceção, a metodologia, a análise e a interpretação de abordagens fatoriais, que vão desde a forma mais simples (bifatorial) às formas mais complexas utilizadas na metodologia de ensaio. Apresenta-se a seguir uma lista não exaustiva. Algumas publicações dão exemplos concretos de abordagens comparáveis, incluindo, por vezes, o código para efetuar as análises por recurso a vários pacotes de *software*.

- 1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York: John Wiley & Sons.
- 2) Box G.E.P. & Draper, N.R. *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.
- 3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. *Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

⁽¹⁾ Os estatísticos que adotem uma metodologia de modelização como a dos modelos lineares gerais (GLM) podem realizar esta análise de uma forma diferente, embora comparável, sem utilizarem necessariamente o tradicional quadro ANOVA, que, para os cálculos estatísticos, recorre a métodos algorítmicos da era pré-informática.

- 4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.
 - 5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.
 - 6) Winer, B.J. Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.
 - 7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.
-

Apêndice 3

LIMITAÇÕES ATUAIS DO ENSAIO

No estado atual dos conhecimentos, o ensaio dos cometas *in vivo* apresenta várias limitações. Espera-se que, à medida que se acumule experiência com a aplicação do ensaio, estas limitações sejam reduzidas ou definidas com maior precisão, de modo a responder às questões de segurança num contexto regulamentar.

1. Alguns tipos de lesões do ADN podem ser de curta duração, ou seja, as lesões podem ser reparadas depressa de mais para permanecerem detetáveis 24 horas ou mais após a administração da última dose. Não há nenhuma lista dos tipos identificáveis de danos de curta duração, nem dos produtos químicos suscetíveis de provocar esse tipo de danos, nem se conhece o período durante o qual os danos em causa podem ser detetados. O tempo de amostragem ótimo pode também depender do produto químico ou da via de exposição, pelo que os tempos de amostragem devem ser determinados a partir de dados cinéticos (p. ex., T_{max} , no qual é atingido o pico de concentração no plasma ou no tecido), sempre que esses dados estiverem disponíveis. Na sua maioria, os estudos de validação que fundamentam o presente método de ensaio preconizam a realização da autópsia 2 ou 3 horas após a administração da última dose. Na sua maioria, os estudos publicados referem a administração da última dose entre 2 e 6 horas antes da eutanásia. Estes estudos constituíram a base para a recomendação (constante do método de ensaio) de que, na ausência de dados que indiquem o contrário, a última dose deve ser administrada num determinado momento entre 2 e 6 horas antes da autópsia.
2. Não há dados de estudos identificáveis que analisem a sensibilidade do método de ensaio para deteção de lesões de curta duração no ADN após a administração de alimentos ou de água, em comparação com a administração por sonda esofágica. Detetaram-se danos no ADN após a administração de produtos químicos nos alimentos e na água, mas as ocorrências comunicadas são relativamente poucas, em comparação com os casos de administração por sonda esofágica e por via intraperitoneal. Portanto, a sensibilidade do ensaio pode ser reduzida no caso de produtos químicos administrados através dos alimentos ou da água que provoquem danos efêmeros.
3. Não foram realizados estudos interlaboratoriais com outros tecidos além do fígado e do estômago, pelo que não se pôde estabelecer nenhuma recomendação quanto ao modo de obter uma resposta sensível e reprodutível em outros tecidos além do fígado, nomeadamente no que respeita às gamas previstas de controlo positivo e negativo. Relativamente ao fígado, também não foi possível chegar a acordo sobre a fixação de um limite inferior para o valor de controlo negativo.
4. Embora vários artigos publicados demonstrem que o estudo da citotoxicidade *in vitro* pode levar a conclusões confusas, publicaram-se pouquíssimos dados relativos a ensaios *in vivo*, pelo que não é possível recomendar nenhuma medida de citotoxicidade. As alterações histopatológicas como a inflamação, a infiltração de células ou as alterações apoptóticas ou necróticas foram associadas a aumentos na migração do ADN; no entanto, o ensaio de validação JaCVAM demonstrou (OCDE, 2014) que essas alterações nem sempre resultam em resultados positivos no ensaio dos cometas, pelo que não existe nenhuma lista definitiva de alterações histopatológicas sistematicamente associável ao aumento da migração de ADN. Foi já sugerida a possibilidade de considerar os «ouriços» (também chamados «nuvens» ou células-fantasma) indicadores de citotoxicidade, embora a sua etiologia seja incerta. Há dados indicativos de que podem ser causados por citotoxicidade de origem química, por danos mecânicos ou de natureza enzimática iniciados durante a preparação da amostra (Guerard *et al.*, 2014) e/ou por um efeito de genotoxicidade mais intenso do produto químico em estudo. Outros dados parecem mostrar que são devidos a lesões extensas, mas eventualmente reparáveis, no ADN (Lorenzo *et al.*, 2013).
5. Alguns tecidos e núcleos de células foram congelados com êxito para análise posterior. Este processo produz, em geral, um efeito mensurável na resposta ao veículo e no controlo positivo (Recio *et al.*, 2010; Gerberick *et al.* (2012). Gerberick *et al.* (2013). Se for utilizado, o laboratório deve demonstrar competência no domínio das metodologias de congelamento e confirmar a obtenção de gamas suficientemente baixas de percentagens de ADN de «cauda» nos tecidos-alvo dos animais expostos ao veículo, de forma a que continuem a ser detetáveis respostas positivas. A literatura especializada descreve o congelamento de tecidos por recurso a diversos métodos. Todavia, não existe ainda consenso quanto à melhor forma de congelar e descongelar tecidos, bem como de avaliar se uma resposta potencialmente alterada pode afetar a sensibilidade do ensaio.
6. Alguns trabalhos recentes demonstram que a lista das variáveis críticas deverá continuar a reduzir-se e que os parâmetros das variáveis críticas serão definidos de forma mais precisa (Guerard *et al.*, 2014).

Referências

- 1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.
- 2) GJackson, P. *et al.* (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.
- 3) Lorenzo, Y. *et al.* (2013), **The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead**, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.
- 4) OCDE (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- 5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.
- 6) Recio, L. *et al.* (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.»

16) Na parte C, o capítulo C.13 é substituído pelo seguinte texto:

«C.13 Bioacumulação em peixes: exposição pelas vias aquosa e alimentar

INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 305 (2012) da OCDE. O principal objetivo da presente revisão do método de ensaio engloba duas vertentes. Em primeiro lugar, visa integrar um ensaio de bioacumulação por via alimentar ⁽¹⁾ adequado para determinar o potencial de bioacumulação das substâncias muito pouco solúveis na água. Em segundo lugar, visa criar um método de ensaio que, sempre que adequado, utilize um número mais reduzido de peixes por razões de proteção dos animais e que seja mais eficaz em termos de custos.

Nos anos decorridos desde a adoção do método de ensaio consolidado C.13 (1), inúmeras substâncias foram objeto de ensaios e os laboratórios, bem como as entidades reguladoras, adquiriram experiência significativa. Tal conduziu à convicção de que a complexidade do ensaio pode ser reduzida caso sejam cumpridos critérios específicos (cf. ponto 88) e de que é possível uma abordagem escalonada. A experiência demonstrou igualmente que fatores biológicos como o crescimento e o teor de lípidos dos peixes podem afetar significativamente os resultados e pode ser necessário tomá-los em consideração. Por outro lado, já foi reconhecido que a realização de ensaios a substâncias muito pouco solúveis na água pode ser tecnicamente impossível. Por outro lado, no que se refere às substâncias muito pouco solúveis na água, a exposição através do meio aquático pode ser de importância limitada em relação à via alimentar. O que precede conduziu ao desenvolvimento de um método de ensaio no qual os peixes são expostos por via alimentar (cf. pontos 7-14 e 97 e seguintes). A validação (ensaio interlaboratorial) do ensaio de exposição por via alimentar foi realizada em 2010 (51).

As principais alterações são as seguintes:

- A utilização de uma única concentração de ensaio pode ser considerada suficiente, sempre que seja provável que o fator de bioconcentração (BCF) não dependa da concentração de ensaio.
- Ensaio de exposição aquosa de conceção minimizada no qual é possível utilizar um número reduzido de pontos de amostragem, caso se cumpram critérios específicos.

⁽¹⁾ Ver apêndice 1 para definições e unidades

- Deve medir-se o teor de lípidos dos peixes para que seja possível expressar o BCF numa base de 5 % de teor de lípidos.
- Maior ênfase na estimativa do BCF cinético (sempre que possível) a par da estimativa do BCF em estado estacionário.
- No que diz respeito a determinados grupos de substâncias, será proposto um ensaio de exposição por via alimentar, nos casos em que tal se considere mais adequado do que um ensaio de exposição aquosa.
- Os peixes devem ser pesados de modo a corrigir o BCF_k em função da diluição de crescimento.

Antes de se efetuar qualquer ensaio de bioacumulação, deve dispor-se da seguinte informação sobre a substância em estudo:

- (a) Sensibilidade da técnica analítica para a medição das concentrações nos tecidos, na água ou nos alimentos tanto da substância em estudo como de possíveis metabolitos (cf. ponto 65).
- (b) Solubilidade em água [método A.6; (2)]; deve ser determinada por um método adequado para o intervalo (estimado) da solubilidade com vista a obter um valor fiável. No respeitante às substâncias hidrófobas, utiliza-se, em geral, o método de eluição em coluna.
- (c) Coeficiente de partição *n*-octanol/água K_{ow} ⁽¹⁾ [métodos A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)]; ou outras informações adequadas sobre o comportamento de partição (por exemplo, adsorção/dessorção em lípidos, K_{oc}); Estes parâmetros devem ser determinados por um método adequado para o intervalo (estimado) do K_{ow} , com vista a obter um valor fiável. No respeitante às substâncias hidrófobas, este será, em geral, o método de agitação lenta [método A.23 (6)];
- (d) Estabilidade da substância em água (hidrólise [método C.7 (7)]);
- (e) Estabilidade da substância nos alimentos (especificamente quando é selecionado um método de ensaio de exposição por via alimentar);
- (f) Dados sobre fototransformação relevantes para as condições de irradiação do ensaio (8);
- (g) Tensão superficial (no caso de substâncias cujo $\log K_{ow}$ não possa ser determinado) [método A.5 (9)];
- (h) Pressão de vapor [método A.4 (10)];
- (i) Quaisquer informações sobre degradação biótica ou abiótica em água, tais como — mas não exclusivamente — a biodegradabilidade «fácil» [métodos C.4 partes II a VII (11), C.29 (12)], sempre que adequado;
- (j) Informações sobre metabolitos: estrutura, $\log K_{ow}$, formação e degradabilidade, sempre que adequado;
- (k) Constante de dissociação (pK_a) para substâncias ionizáveis. Se necessário, o pH da água do ensaio deve ser ajustado para garantir que a substância se encontra na sua forma não ionizada no ensaio, caso tal seja compatível com as espécies de peixes.

Independentemente do método de exposição ou do sistema de amostragem selecionado, o presente método de ensaio descreve um procedimento para a caracterização do potencial de bioacumulação de substâncias nos peixes. Embora seja largamente preferível o recurso a regimes dinâmicos, podem também utilizar-se regimes semiestáticos, na condição de serem satisfeitos os critérios de validade (cf. pontos 24 e 113). No caso da exposição por via alimentar, o regime dinâmico não é necessário para manter as concentrações da substância em estudo na água, mas ajudará a manter concentrações adequadas de oxigénio dissolvido e contribuirá para proporcionar água limpa e eliminar influências, por exemplo, dos produtos de excreção.

⁽¹⁾ Por vezes referido como P_{ow} ; é determinado por um método de agitação do recipiente no método A.8 (4), um método de HPLC no método A.24 (5) e um método de agitação lenta no método A.23 (6). O método de colunas geradoras é ocasionalmente utilizado para a determinação do $\log K_{ow}$. Encontra-se disponível um número limitado de estudos que utilizam este método, sobretudo para dibenzodioxinas e bifenilos clorados (por exemplo, Li e Doucette, 1993) (3). No que diz respeito às substâncias ionizáveis, o $\log K_{ow}$ deve referir-se à forma não ionizada.

Independentemente do método selecionado, o presente protocolo fornece informações suficientes para a realização do ensaio, permitindo todavia a adaptação das condições experimentais ao perfil dos laboratórios e às características dos produtos químicos em estudo. O ensaio de exposição em meio aquoso é mais adequado às substâncias orgânicas estáveis com $\log K_{ow}$ compreendido entre 1,5 e 6,0 (13) podendo, no entanto, aplicar-se também a substâncias muito hidrófobas ($\log K_{ow} > 6,0$), se for possível demonstrar que a substância se dissolve totalmente na água, produzindo uma concentração estável. Se tal não for possível, um estudo em meio aquoso não é adequado, sendo necessário um método por via alimentar para proceder ao ensaio da substância em peixes — embora a interpretação e utilização dos resultados do ensaio por via alimentar possam depender do quadro regulamentar. A equação de Bintein *et al.* (14) permite obter uma estimativa preliminar do fator de bioconcentração (BCF, por vezes designado K_b) de substâncias orgânicas com valores $\log K_{ow}$ até 9,0. A estimativa preliminar do fator de bioconcentração das referidas substâncias muito hidrófobas pode ser superior ao fator de bioconcentração do estado estacionário (BCF_{ss}) obtido por via experimental, especialmente quando é utilizado um modelo linear simples para a estimativa preliminar. Os parâmetros que caracterizam o potencial de bioacumulação incluem a constante de velocidade de fixação (k_1) e constantes da velocidade de perda tais como a constante da velocidade de depuração (k_2), o fator de bioconcentração do estado estacionário (BCF_{ss}), o fator de bioconcentração cinético (BCF_k) e o fator de bioamplificação por via alimentar (BMF) ⁽¹⁾.

O recurso a substâncias com marcação radioativa poderá facilitar a análise de amostras de água, alimentos e de peixes, bem como a determinação da necessidade de identificar e quantificar os metabolitos. Se os resíduos radioativos totais forem medidos isoladamente (por exemplo, por combustão ou solubilização de tecidos), o BCF ou BMF é calculado com base no total da substância de origem, quaisquer metabolitos fixados e também no carbono assimilado. Portanto, os valores BCF ou BMF calculados com base nos resíduos radioativos não são diretamente comparáveis a um BCF ou BMF decorrente de análise química específica da substância de origem. É possível utilizar procedimentos de separação como TLC, HPLC ou GC ⁽²⁾ antes da análise em estudos com marcação radioativa para determinar o BCF ou BMF com base na substância de origem. Sempre que se utilizem técnicas de separação, deve proceder-se à identificação e quantificação da substância de origem e dos metabolitos relevantes ⁽³⁾ (cf. ponto 65) caso o BCF ou BMF seja calculado com base na concentração da substância de origem nos peixes e não no total dos resíduos com marcação radioativa. É também possível combinar um estudo de metabolismo dos peixes ou de distribuição *in vivo* com um estudo de bioacumulação, mediante a análise e identificação dos resíduos em tecidos. A possibilidade de realizar um estudo de metabolismo pode ser prevista por instrumentos adequados — por exemplo, ferramenta QSAR da OCDE (15) e programas exclusivos desta ferramenta.

A decisão de realizar um ensaio de exposição por via aquosa ou alimentar, bem como a configuração deste, devem basear-se nos fatores enumerados no ponto 3, tomados em consideração em conjunto com o quadro regulamentar aplicável. Por exemplo, no que se refere às substâncias com $\log K_{ow}$ elevado que apresentam, todavia, uma solubilidade considerável em água no que diz respeito à sensibilidade das técnicas analíticas disponíveis, considerar-se-ia primeiramente um ensaio de exposição aquosa. Contudo, é possível que as informações relativas à solubilidade em água não sejam definitivas no que se refere a estes tipos de substâncias hidrófobas, pelo que se deve ponderar a possibilidade de preparar concentrações aquosas dissolvidas estáveis e quantificáveis (não são permitidas emulsões estáveis) adequadas a um estudo de exposição aquosa, antes da tomada de uma decisão sobre o método de ensaio a utilizar (16). Não é possível apresentar orientações normativas exatas sobre o método a utilizar com base em critérios de exclusão relativos à solubilidade em água e ao coeficiente de partição octanol-água, uma vez que outros fatores (técnicas analíticas, degradação, adsorção, etc.) podem influenciar significativamente a aplicabilidade do método pelos motivos apresentados supra. Porém, um $\log K_{ow}$ superior a 5 e uma solubilidade em água inferior a ~ 0,01 — 0,1 mg/l identificam o conjunto de substâncias cujo ensaio através de exposição aquosa se pode tornar cada vez mais difícil.

Devem tomar-se em conta outros fatores que podem influenciar a seleção do ensaio, como o potencial de adsorção da substância nos recipientes e equipamentos de ensaio, a sua estabilidade em solução aquosa por oposição à estabilidade no alimento para peixes (17) (18), etc.

⁽¹⁾ Ver apêndice 1 para definições e unidades

⁽²⁾ TLC: cromatografia em camada fina; HPLC: cromatografia em fase líquida a alta pressão; GC: cromatografia gasosa

⁽³⁾ Em alguns quadros regulamentares, a análise dos metabolitos pode ser obrigatória quando estiverem reunidas determinadas condições (cf. ponto 65).

É possível encontrar informações sobre estes aspetos práticos noutros estudos em meio aquoso já realizados. Encontram-se disponíveis na bibliografia informações adicionais sobre a avaliação dos aspetos relativos ao desempenho dos estudos de bioacumulação (por exemplo, (19)).

No que se refere às substâncias cuja solubilidade ou manutenção da concentração aquosa, bem como a análise destas concentrações, não representem um obstáculo à aplicação de um método de exposição aquosa, o presente método é preferível para determinar o potencial de bioconcentração da substância. De qualquer modo, deve verificar-se se a concentração ou concentrações de exposição por via aquosa a utilizar se encontram dentro dos limites de solubilidade em água dos meios de ensaio. É possível utilizar diferentes métodos para manter a estabilidade das concentrações da substância em estudo dissolvida, tais como soluções de reserva ou sistemas de dosagem passiva (por exemplo, método de eluição em coluna), desde que se consiga demonstrar que é possível manter concentrações estáveis e os meios de ensaio não se desviem dos recomendados no ponto 27.

No que se refere às substâncias muito hidrófobas ($\log K_{ow} > 5$ e a uma solubilidade inferior a $\sim 0,01-0,1$ mg/l), o ensaio através de exposição aquosa pode tornar-se difícil. Os motivos para as limitações podem ser a impossibilidade de manter a concentração aquosa a um nível considerado suficientemente constante (por exemplo, devido à adsorção/dessorção para o vidro dos recipientes de exposição ou a fixação rápida pelos peixes) ou ao facto de as concentrações aquosas a aplicar serem tão reduzidas que se encontram no mesmo intervalo que o limite analítico de quantificação, ou abaixo deste ⁽¹⁾. Para estas substâncias, recomenda-se o ensaio por via alimentar, desde que este seja coerente com o quadro regulamentar aplicável e as necessidades de avaliação dos riscos.

No que se refere aos agentes tensioativos, deve analisar-se se o ensaio de bioconcentração aquosa é viável, atendendo às propriedades da substância; caso contrário, o estudo por via alimentar é provavelmente mais adequado. Os agentes tensioativos são agentes que atuam na superfície, reduzindo a tensão interfacial entre dois líquidos. A sua natureza anfipática (*ou seja*, contém uma parte hidrófila e uma parte hidrófoba) faz com que se acumulem em interfaces como a interface água-ar, a interface água-alimento e as paredes de vidro, o que dificulta a determinação da sua concentração aquosa.

O ensaio por via alimentar pode contornar alguns dos aspetos da exposição no que se refere a misturas complexas com componentes de limites distintos de solubilidade em água, na medida em que a exposição comparável a todos os componentes da mistura é mais provável do que no método aquoso (*cf.* (20)).

Importa salientar que o método por via alimentar produz um fator de bioamplificação em vez de um fator de bioconcentração (BCF) ⁽²⁾. Encontram-se disponíveis métodos para estimar um fator de bioconcentração cinético (BCF_K) a partir dos dados gerados no estudo por via alimentar (tal como discutido no apêndice 8, mas estes métodos devem ser utilizados com precaução. Em geral, estes métodos pressupõem uma cinética de primeira ordem e são aplicáveis apenas a determinados grupos de substâncias. É pouco provável que estes métodos sejam aplicáveis a agentes tensioativos (ver ponto 12).

Deve utilizar-se um ensaio de exposição aquosa de tipo minimizado, com menos pontos de amostragem, para reduzir o número de animais e/ou recursos (*cf.* ponto 83 e seguintes) apenas às substâncias relativamente às quais existem motivos para prever que a fixação e a depuração seguirão aproximadamente uma cinética de primeira ordem (*ou seja*, em geral, substâncias orgânicas não ionizadas -*cf.* ponto 88).

⁽¹⁾ Em geral, as concentrações medidas na água durante a fase de fixação devem ser, pelo menos, de uma ordem de grandeza superior ao limite de quantificação, de modo a que seja possível medir mais do que uma semivida de carga corporal na fase de depuração do estudo.

⁽²⁾ Ver apêndice 1 para definições e unidades

C.13 — I Ensaio de bioconcentração da exposição aquosa em peixes

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O ensaio compreende duas fases: a fase de exposição (fixação) e a fase de pós-exposição (depuração). Durante a fase de fixação, um grupo de peixes de uma espécie é exposto à substância em estudo numa ou mais concentrações selecionadas, em função das propriedades da substância em estudo (cf. ponto 49). Seguidamente, os animais são transferidos para um meio isento da referida substância, onde decorre a fase de depuração. Esta última é sempre necessária, exceto no caso de a quantidade de substância absorvida na fase de fixação ser desprezável. A concentração da substância em estudo no peixe ou em determinados tecidos do mesmo é monitorizada em ambas as fases do ensaio. Além do grupo exposto, submete-se um grupo de peixes a condições idênticas, exceto no que respeita à substância em estudo, que é omitida, de modo a estabelecer uma correlação entre os eventuais efeitos negativos observados no ensaio de bioconcentração com um grupo de controlo de referência e a obter as concentrações de fundo da substância em estudo ⁽¹⁾.

No ensaio de exposição por via aquosa, a fase de fixação dura, em geral, 28 dias. A duração pode ser prolongada, se necessário (cf. ponto 18), ou reduzida, caso se demonstre o surgimento precoce do estado estacionário (ver apêndice 1, definições e unidades). As equações que se apresentam no apêndice 5 permitem prever a duração da fase de fixação, bem como o surgimento do estado estacionário. O período de depuração inicia-se quando os peixes deixam de estar expostos à substância em estudo, com a sua transferência para um meio idêntico que não contenha a substância em estudo, num recipiente limpo. Sempre que possível, calcula-se o fator de bioconcentração preferencialmente como a razão entre a concentração nos peixes (C_f) e na água (C_w) em estado estacionário (BCF_{ss} ; ver apêndice 1, definição) e como um fator de bioconcentração cinético (BCF_k ; ver apêndice 1, definições e unidades), que se estima como a razão entre as constantes de velocidade de fixação (k_1) e de depuração (k_2) pressupondo uma cinética de primeira ordem ⁽²⁾.

Caso o estado estacionário não surja no prazo de 28 dias, calcula-se o BCF através do método cinético (cf. ponto 38), podendo também prolongar-se a fase de fixação. Se, desta forma, se obtiver uma fase de fixação cuja duração, até atingir o estado estacionário, a torne impraticável (cf. pontos 37 e 38, apêndice 5), é preferível utilizar o método cinético. Em alternativa, deve ponderar-se a realização de um ensaio por via alimentar para as substâncias muito hidrófobas ⁽³⁾, desde que este ensaio seja coerente com o quadro regulamentar aplicável.

A constante de velocidade de fixação, a constante de velocidade de depuração (ou constantes, no caso da aplicação de modelos mais complexos), o fator de bioconcentração (cinético e/ou em estado estacionário) e, sempre que possível, os intervalos de confiança de cada parâmetro, devem ser calculados com base no modelo mais adequado à descrição das concentrações da substância em estudo nos peixes e na água (cf. apêndice 5).

O aumento da massa dos peixes durante o ensaio resultará numa diminuição da concentração da substância em estudo nos peixes em crescimento (denominada diluição de crescimento); como tal, o BCF cinético será subestimado se não for corrigido em função do crescimento (cf. pontos 72 e 73).

O BCF é calculado com base na concentração total nos peixes (ou seja, em função da massa húmida total dos peixes). Todavia, podem utilizar-se, para fins específicos, determinados tecidos ou órgãos (por exemplo, tecido muscular ou fígado), caso as dimensões dos animais o permitam; podem também dividir-se os peixes em porções comestíveis e não comestíveis (vísceras). Uma vez que, no que respeita a muitas substâncias orgânicas, existe uma nítida relação entre o potencial de bioconcentração e a hidrofobia, existe também uma relação entre o teor de lípidos dos peixes em estudo e a bioconcentração das substâncias em causa. Assim, de modo a reduzir a variabilidade dos resultados, no que respeita às substâncias com elevada lipofilia (ou seja, com $\log K_{ow} > 3$), a bioconcentração deve ser expressa de modo normalizado para um peixe com um teor de lípidos de 5 % (com base na massa corporal húmida total), para além da obtida diretamente a partir do estudo. Tal é necessário para proporcionar uma base que permita a comparação dos resultados de diferentes substâncias e/ou espécies objeto de ensaio entre si. O valor de 5 % de teor de lípidos tem sido amplamente utilizado, já que representa o teor médio de lípidos dos peixes habitualmente utilizados neste método de ensaio (21).

⁽¹⁾ No que se refere à maior parte das substâncias em estudo, não se deve, idealmente, efetuar determinações na água de controlo. As concentrações de fundo só devem ser relevantes no caso dos materiais presentes na natureza (por exemplo, alguns metais) e as substâncias muito disseminadas no ambiente.

⁽²⁾ Caso seja inequívoco que o processo não segue uma cinética de primeira ordem, há que recorrer a modelos mais complexos (ver referências no apêndice 5), procurando a orientação de um perito em bioestatística.

⁽³⁾ A fixação pode ser limitada por concentrações de exposição reduzidas devido à pouca solubilidade em água no ensaio de bioconcentração, ao passo que é possível atingir concentrações de exposição muito superiores com o ensaio por via alimentar.

INFORMAÇÕES RELATIVAS À SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

Para além das propriedades da substância em estudo apresentadas na introdução (ponto 3), as outras informações necessárias são a toxicidade para a espécie de peixe a utilizar no ensaio, de preferência a toxicidade assintótica LC_{50} (isto é, independente do tempo) e/ou a toxicidade estimada a partir de ensaios a longo prazo com peixes [p. ex., métodos C.47 (22), C.15 (23), C.14 (24)].

Para a quantificação da substância nas soluções de ensaio, bem como no material biológico, deve utilizar-se um método analítico adequado, de exatidão, precisão e sensibilidade conhecidas, devendo possuir-se informações pormenorizadas sobre a preparação e armazenagem da amostra. Deve também conhecer-se o limite de quantificação da substância em estudo na água e nos tecidos dos peixes. Sempre que se utilizem substâncias com marcação radioativa, estas devem ser de um grau de pureza extremamente elevado (por exemplo, de preferência > 98 %) e a percentagem de radioatividade associada às impurezas deve ser conhecida.

VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio será considerado válido se se verificarem as seguintes condições:

A variação da temperatura da água deve ser inferior a ± 2 °C, uma vez que grandes desvios podem afetar os parâmetros biológicos relevantes para a fixação e a depuração, além de provocarem tensão aos animais;

A concentração de oxigénio dissolvido não deve ser inferior a 60 % da concentração de saturação;

A variação da concentração da substância em estudo nas células não deve exceder ± 20 % da média dos valores determinados na fase de fixação;

A concentração da substância em estudo deve ser inferior ao seu limite de solubilidade em água, tomando em consideração o efeito que a água utilizada no ensaio pode ter na solubilidade real ⁽¹⁾;

A mortalidade ou quaisquer outros efeitos nocivos registados no final do ensaio, tanto no que respeita ao lote de controlo como ao lote de ensaio, deve ser inferior a 10 %; caso o ensaio se prolongue por várias semanas ou meses, os referidos efeitos não devem exceder 5 % por mês e 30 % na totalidade. Diferenças significativas no crescimento médio entre os lotes de controlo e de ensaio dos peixes recolhidos para amostra podem indicar um efeito tóxico da substância em estudo.

SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

A utilização de substâncias de referência às quais se conhece um potencial de bioconcentração e um metabolismo reduzido é útil na verificação do procedimento experimental, sempre que necessário (por exemplo, caso um laboratório não disponha de experiência anterior no ensaio ou tenham ocorrido alterações nas condições experimentais).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Equipamento

Deve evitar-se a utilização de materiais — no que se refere à totalidade do equipamento — que apresentem riscos de dissolução, absorção ou lixiviação, ou possam ter efeitos nocivos nos animais. Podem utilizar-se tanques paralelepípedicos ou cilíndricos normalizados, de um material quimicamente inerte, com capacidade adequada à população (cf. ponto 43). Deve reduzir-se ao mínimo a utilização de tubos de plástico flexível. Em vez disso, devem utilizar-se tubos de politetrafluoroetileno, aço inoxidável e/ou vidro. A experiência tem demonstrado que, no caso de substâncias em estudo com um coeficiente de adsorção elevado, nomeadamente os piretróides sintéticos, pode ser necessário utilizar vidro silanizado. Em tais casos, o equipamento deve ser descartado após o uso. É preferível expor os sistemas em estudo a concentrações da substância a utilizar no ensaio durante o tempo necessário para demonstrar a manutenção de concentrações de exposição estáveis previamente à introdução dos organismos utilizados no ensaio.

⁽¹⁾ No que diz respeito às substâncias formadas por vários constituintes, UVCB e misturas, há que ter em conta a solubilidade em água de cada componente relevante para determinar as concentrações de exposição adequadas.

Água

Em princípio, o ensaio deve utilizar água natural proveniente de uma fonte não contaminada e de qualidade uniforme. Contudo, a utilização de água reconstituída (*ou seja*, água desmineralizada com adição de nutrientes específicos em quantidades conhecidas) pode ser mais adequada para garantir uma qualidade uniforme ao longo do tempo. A qualidade da água de diluição, que é a água misturada com a substância em estudo antes da introdução no recipiente de ensaio (*cf.* ponto 30), deve permitir a sobrevivência da espécie de peixes selecionada durante as fases de aclimação e de ensaio, sem que os animais adquiram uma aparência ou um comportamento anormais. Em condições ideais, a espécie em causa deve poder sobreviver, desenvolver-se e reproduzir-se na água de diluição (nomeadamente em cultura laboratorial ou num ensaio de toxicidade em toda a vida). No que se refere à água de diluição, devem conhecer-se, pelo menos, o pH, a dureza, os sólidos totais, o carbono orgânico total (COT ⁽¹⁾), bem como, de preferência, o teor de amónio e de nitritos, a alcalinidade e, no caso de ensaios com espécies marinhas, a salinidade. Os parâmetros que possuem importância para o bem-estar dos animais não são bem conhecidos; contudo, o apêndice 2 apresenta as concentrações máximas recomendadas de diversos fatores em águas doces e salgadas.

A qualidade da água de diluição deve manter-se constante no decurso do ensaio. O pH deve oscilar entre 6,0 e 8,5 no início do ensaio, embora, no decurso do mesmo, a respetiva variação não deva exceder $\pm 0,5$. De modo a assegurar que a água de diluição não influencie indevidamente o resultado (por complexação da substância em estudo, por exemplo) ou afete de forma desfavorável o desempenho do lote de peixes, deverão ser retiradas amostras regularmente para análise, pelo menos no início e no final do ensaio. Deve determinar-se o teor de metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, por exemplo), dos principais aniões e catiões (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , e SO_4^{2-} etc.), de pesticidas (pesticidas organofosforados totais, pesticidas organoclorados totais, etc.), de carbono orgânico total e de sólidos em suspensão. Se a qualidade da água de diluição se mantiver relativamente constante, estas medições podem realizar-se, por exemplo, de três em três meses. Caso se demonstre que a qualidade da água de diluição se mantém inalterada durante, pelo menos, um ano, as determinações podem ser menos frequentes (de seis em seis meses, por exemplo).

O teor de partículas naturais, bem como de carbono orgânico total, da água de diluição deve ser tão reduzido quanto possível, de modo a evitar a adsorção de substância em estudo pela matéria orgânica, o que pode reduzir a sua biodisponibilidade e resultar numa subestimação do BCF. O valor máximo aceitável é de 5 mg/l, no caso das partículas (matérias secas que não passem através de um filtro de 0,45 μm) e 2 mg/l, no caso do carbono orgânico total (*cf.* apêndice 2). Se necessário, a água de diluição deverá ser filtrada antes do uso. A contribuição das excreções dos peixes e dos resíduos alimentares para o teor de carbono orgânico total na água de ensaio deve manter-se tão reduzida quanto possível (*cf.* ponto 46).

Soluções de ensaio

Deve preparar-se uma solução de reserva da substância em estudo com uma concentração adequada. De preferência, a solução de reserva deve ser preparada simplesmente por mistura ou agitação da substância em estudo na água de diluição. Uma alternativa que pode ser adequada em alguns casos é a utilização de um sistema de dosagem de dessorção em fase sólida. Em geral, não se recomenda a utilização de solventes e dispersantes (agentes solubilizantes) (*cf.* (25)); todavia, a utilização destes materiais pode ser aceitável para produzir uma solução de reserva com uma concentração adequada, mas devem envidar-se todos os esforços para minimizar a utilização destes materiais e não se devem ultrapassar a sua concentração micelar crítica (se relevante). A acetona, o etanol, o metanol, a dimetilformamida e o trietilenoglicol constituem alguns dos solventes que podem ser utilizados; os dispersantes cuja utilização está documentada são o Tween 80, a metilcelulose 0,01 % e o HCO-40. A concentração do solvente no meio de ensaio final deve ser idêntica em todos os procedimentos (*ou seja*, independentemente da concentração da substância em estudo) e não deve exceder os limiares de toxicidade correspondentes determinados para o solvente no âmbito das condições de ensaio. A concentração máxima é de 100 mg/l (*ou* 0,1 ml/l). É pouco provável que uma concentração de 100 mg/l de solvente altere significativamente a concentração máxima dissolvida da substância em estudo que pode ser alcançada no meio (25). Deve conhecer-se a contribuição do solvente (juntamente com a substância em estudo) para o teor de carbono orgânico total da água. No decurso do ensaio, a concentração de carbono orgânico total nos recipientes não deve exceder a concentração de carbono orgânico proveniente da substância em estudo e do solvente ou agente de solubilização ⁽²⁾ — se utilizado — em mais de

⁽¹⁾ O COT inclui o carbono orgânico das partículas e o carbono orgânico dissolvido, *ou seja*, $\text{COT} = \text{COP} + \text{COD}$.

⁽²⁾ Embora em geral não se recomende, caso se utilize um solvente ou um agente de solubilização, o carbono orgânico decorrente deste agente deve ser adicionado ao carbono orgânico da substância em estudo para avaliar a concentração de carbono orgânico nos recipientes de ensaio.

10 mg/l ($\pm 20\%$). O teor de matéria orgânica pode ter um efeito significativo sobre a quantidade de substância em estudo livremente dissolvida durante os ensaios dinâmicos com peixes, especialmente no que se refere às substâncias muito lipófilas. A microextração em fase sólida (cf. ponto 60) pode fornecer informações importantes sobre a razão entre as substâncias ligadas e livremente dissolvidas, partindo-se do princípio de que esta última representa a fração biodisponível. A concentração da substância em estudo deve ser inferior ao limite de solubilidade da substância nos meios de ensaio, não obstante a utilização de um solvente ou agente de solubilização. Os solventes que apresentem biodegradabilidade fácil devem utilizar-se com precaução, uma vez que podem originar problemas de crescimento bacteriano nos ensaios dinâmicos. Caso não seja possível preparar uma solução de reserva sem a utilização de um agente de solubilização, é necessário ponderar a adequação de um estudo de exposição aquosa ao invés de um estudo de exposição por via alimentar.

Nos ensaios dinâmicos, é necessário utilizar um sistema que distribua e dilua continuamente uma solução de reserva da substância em estudo (uma bomba de medição, um diluidor proporcional, um sistema saturador, por exemplo), ou um sistema de dosagem de dessorção em fase sólida, por forma a fornecer as concentrações às células de ensaio. De preferência, devem efetuar-se diariamente pelo menos cinco renovações do volume de cada célula de ensaio. Em princípio, devem utilizar-se condições dinâmicas; todavia, se tal não se afigurar possível (por exemplo, caso os organismos sejam afetados) pode recorrer-se a uma técnica semiestática, na condição de serem satisfeitos os critérios de validade (cf. ponto 24). Os caudais da solução de reserva e da água de diluição devem ser verificados 48 horas antes do início do ensaio e com uma frequência pelo menos diária no decurso do mesmo. A referida verificação inclui a determinação do caudal em cada célula de ensaio, devendo assegurar-se que o mesmo não regista uma variação superior a 20 % num determinada célula ou entre duas células.

Seleção das espécies

Os principais critérios de seleção das espécies consistem na sua fácil disponibilidade, nas dimensões adequadas e na facilidade de manutenção no laboratório. Outros critérios incluem o interesse recreativo e comercial e a importância ecológica, bem como a sensibilidade comparável, utilizações anteriores bem-sucedidas, etc. As espécies de ensaio recomendadas constam do apêndice 3. Podem utilizar-se outras espécies, devendo, contudo, adaptar-se os procedimentos de modo a obter condições de ensaio adequadas. Neste caso, o critério para a seleção das espécies e o método experimental deverão ser indicados no relatório. Em geral, a utilização de espécies de peixes de menor dimensão antecipa o surgimento do estado estacionário, mas pode ser necessário utilizar um número superior de peixes (amostras) para analisar de modo adequado o teor de lípidos e as concentrações da substância em estudo nos peixes. Além disso, é possível que as diferenças na frequência respiratória e no metabolismo entre peixes jovens e mais velhos dificultem a comparação de resultados entre diferentes ensaios e espécies. Importa salientar que as espécies de peixes ensaiadas durante uma fase da vida (juvenil) com crescimento rápido podem complicar a interpretação dos dados.

Confinamento dos peixes (relevante para exposição aquosa e por via alimentar)

A população de reserva deve ser aclimatada durante, pelo menos, duas semanas em água (cf. ponto 28) à temperatura de ensaio, sendo alimentada com uma dieta suficiente (cf. ponto 45). A água e a dieta devem ser do mesmo tipo que as utilizadas durante o ensaio.

Após um período de adaptação de 48 horas, regista-se a mortalidade, aplicando os seguintes critérios:

- mortalidade superior a 10 % da população em sete dias: o lote é rejeitado na sua totalidade;
- mortalidade entre 5 % e 10 % da população em sete dias: aclimatar durante sete dias adicionais — caso se verifique uma mortalidade superior a 5 % durante o segundo período de sete dias, o lote é rejeitado na sua totalidade;
- mortalidade inferior a 5 % da população em sete dias: o lote é aceite.

Os animais a utilizar nos ensaios não devem apresentar doenças ou perturbações observáveis. Todos os peixes doentes devem ser rejeitados. Os peixes não devem receber qualquer tratamento para doenças nas duas semanas anteriores ao ensaio nem durante a realização do mesmo.

REALIZAÇÃO DO ENSAIO

Teste preliminar

Poderá ser útil efetuar um ensaio preliminar com o objetivo de otimizar as condições do ensaio definitivo no que respeita, nomeadamente, à seleção da concentração da substância em estudo e à duração das fases de fixação e de depuração, ou para determinar se será necessário realizar um ensaio completo. A conceção do ensaio preliminar deve conduzir à obtenção das informações necessárias. É possível analisar se um ensaio minimizado será suficiente para obter um BCF, ou se é necessário um estudo completo (cf. pontos 83-95, relativos ao ensaio minimizado).

Condições de exposição*Duração da fase de fixação*

Pode obter-se uma estimativa da duração da fase de fixação com base na experiência prática (por exemplo, dados decorrentes de um estudo anterior ou um estudo de acumulação com uma substância estruturalmente relacionada), bem como em determinadas relações empíricas que utilizam conhecimentos relativos à solubilidade da substância em água ou ao respetivo coeficiente de partição octanol/água (desde que essa fixação siga uma cinética de primeira ordem cf. apêndice 5).

A fase de fixação deve durar, pelo menos, 28 dias, exceto se o estado estacionário for atingido antes (ver apêndice 1, definições e unidades). Um estado estacionário é atingido sempre que a representação gráfica da concentração da substância em estudo nos peixes (C_f) em função do tempo consista numa linha paralela ao eixo dos tempos e três determinações sucessivas de C_f em amostras recolhidas com intervalos de, pelo menos, dois dias, apresentem valores que não difiram em mais de 20 %, na ausência de aumento significativo de C_f entre a primeira e a última determinação sucessivas. No caso das amostras combinadas, são necessárias, pelo menos, quatro determinações. No caso de substâncias cuja fixação é lenta, o intervalo mais adequado é de sete dias. Caso não se atinja o estado estacionário no prazo de 28 dias, deve calcular-se o BCF utilizando apenas o método cinético, que não depende do surgimento do estado estacionário; é possível prolongar a fase de fixação, fazendo medições adicionais, até ao surgimento do estado estacionário ou durante 60 dias, conforme o que for mais curto. Além disso, a concentração da substância em estudo nos peixes no final da fase de fixação deve ser suficientemente elevada para garantir uma estimativa fiável de k_2 a partir da fase de depuração. Caso não se verifique uma fixação significativa após 28 dias, é possível interromper o ensaio.

Duração da fase de depuração

No que diz respeito às substâncias que seguem uma cinética de primeira ordem, basta, em geral, um período com uma duração de metade da fase de fixação para uma redução adequada (isto é, cerca de 95 %) da carga corporal da substância em estudo (cf. apêndice 5 para uma especificação da estimativa). Se o período necessário para a referida redução de 95 % exibir uma extensão que o torne impraticável, excedendo, por exemplo, o dobro da duração normal da fase de fixação (ou seja, mais de 56 dias), pode utilizar-se um período mais curto (por exemplo, até que a concentração da substância em estudo seja inferior a 10 % da concentração do estado estacionário). Todavia, no caso de substâncias com perfis de fixação e de depuração mais complexos, podem ser necessários períodos de depuração mais longos do que no caso de modelos com uma cinética de primeira ordem. Se se observarem e/ou previrem esses perfis complexos, recomenda-se que se solicite o parecer de um perito em bioestatística e/ou farmacocinética para garantir uma instalação de ensaio adequada. À medida que o período de depuração se prolonga, o número de peixes a recolher para amostra pode tornar-se limitador e as diferenças de crescimento entre os peixes podem influenciar os resultados. O período em causa também será definido pelo período durante o qual a concentração da substância em estudo nos peixes permanece superior ao limite analítico de quantificação.

Número de peixes

O número de peixes a utilizar por concentração de ensaio deve ser selecionado de forma a que se disponha de, pelo menos, quatro animais por ponto de amostragem. Os peixes só devem ser agrupados se a análise de um único peixe não for exequível. Caso se pretenda uma precisão mais elevada no ajustamento das curvas (e dos parâmetros derivados), ou se forem necessários estudos do metabolismo — p. ex., para distinguir entre metabolitos e substância de origem em caso de utilização de substâncias com marcação radioativa —, serão necessários mais peixes por ponto de amostragem. Deve determinar-se o teor de lípidos do material biológico utilizado para determinar a concentração da substância em estudo. Se tal não for possível, podem ser necessários peixes adicionais (cf. pontos 56 e 57).

Caso se utilizem peixes adultos (*ou seja*, que atingiram a maturidade sexual), estes não se devem encontrar num estado de desova ou recentemente desovados, quer antes quer durante o ensaio. Deve especificar-se ainda o sexo utilizado. Caso se utilizem ambos os sexos, deve registar-se que as diferenças no crescimento e no teor de lípidos entre sexos não são significativas antes do início da exposição, nomeadamente caso se preveja que será necessário o agrupamento de peixes de ambos os sexos para garantir um teor de lípidos e/ou concentrações detetáveis da substância.

Em qualquer ensaio, selecionam-se peixes de massa semelhante, de modo que a massa do mais leve não seja inferior a $\frac{2}{3}$ da massa do mais pesado. Os peixes devem ser da mesma coorte (classe etária) e da mesma proveniência. Uma vez que a massa e a idade dos peixes podem apresentar um efeito significativo nos valores do BCF (12), esses dados devem registar-se de forma precisa. Recomenda-se a pesagem de uma amostra do lote de peixes pouco antes do início do ensaio, de modo a calcular a massa média (*cf.* ponto 61).

Carga

Devem utilizar-se rácios elevados água/peixes, de modo a minimizar a redução da concentração da substância em estudo na água, provocada pela introdução dos peixes no início do ensaio, bem como a evitar o decréscimo da concentração do oxigénio dissolvido. A taxa de carga deve ser adequada às espécies utilizadas. Recomenda-se, em geral, uma taxa diária peixes/água de 0,1 a 1,0 g de peixes (massa húmida) por litro de água. Caso a concentração requerida da substância em estudo não registre uma variação superior a $\pm 20\%$ e a quantidade de oxigénio dissolvido não atinja valores inferiores a 60 % da concentração de saturação, podem utilizar-se taxas de carga peixes/água mais elevadas (*cf.* ponto 24).

Na seleção dos regimes de carga adequados deve ter-se em conta o habitat normal das espécies em causa. Por exemplo, as espécies bentónicas necessitam de aquários com maior área de base em comparação com as espécies pelágicas, para o mesmo volume de água.

Alimentação

Durante os períodos de aclimação e de ensaio, os peixes são alimentados com uma dieta adequada, com teor total de lípidos e de proteínas conhecido, numa quantidade suficiente para mantê-los em condições saudáveis e manter constante a respetiva massa corporal (é permitido algum crescimento). Os peixes devem ser alimentados diariamente durante os períodos de aclimação e de ensaio a um nível definido em função da espécie utilizada, das condições experimentais e do valor calórico dos alimentos (por exemplo, para as trutas-arco-íris entre aproximadamente 1 % e 2 % da massa corporal por dia). A taxa de alimentação deve ser selecionada de modo a evitar o crescimento rápido e um grande aumento do teor de lípidos. Para manter a mesma taxa de alimentação, deve recalcular-se a quantidade de alimentos conforme adequado, por exemplo, uma vez por semana. Para tal, pode estimar-se a massa dos peixes de cada célula de ensaio com base na massa do peixe mais recentemente retirado da mesma. Não devem pesar-se os peixes que permanecem na célula.

Os alimentos remanescentes e as fezes devem ser removidos diariamente das células de ensaio, 30 minutos a 1 hora após o fornecimento dos alimentos. As células devem manter-se tão limpas quanto possível ao longo do ensaio, de modo a que a concentração de matérias orgânicas seja mantida aos níveis mais reduzidos (*cf.* ponto 29), uma vez que a presença de carbono orgânico pode limitar a biodisponibilidade da substância em estudo (12).

Uma vez que muitos alimentos contêm ingredientes à base de peixe, deve garantir-se que estes não influenciarão os resultados do ensaio nem provocarão efeitos adversos — por exemplo, por conterem vestígios de pesticidas, metais pesados e/ou a própria substância em estudo.

Luz e temperatura

Recomenda-se um fotoperíodo de 12 a 16 horas e a temperatura ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) deve ser adequada à espécie em estudo (*cf.* apêndice 3). Devem conhecer-se o tipo e as características da iluminação. Deve atender-se à eventual fototransformação da substância em estudo nas condições de irradiação do ensaio. Devem utilizar-se fontes de iluminação adequadas, de modo a evitar a exposição dos animais a produtos de fotólise não naturais. Em alguns casos, pode afigurar-se adequado utilizar um filtro que elimine as radiações ultravioletas de comprimento de onda inferior a 290 nm.

Concentrações de ensaio

O ensaio foi originalmente concebido para substâncias orgânicas não polares. No que diz respeito a este tipo de substância, prevê-se que a exposição dos peixes a um valor único de concentração seja suficiente, já que não se preveem efeitos da concentração, embora o quadro regulamentar aplicável possa exigir duas concentrações. Caso sejam ensaiadas substâncias não abrangidas por esta gama, ou sejam conhecidas outras indicações de possível dependência da concentração, o ensaio deve ser realizado com duas ou mais concentrações. Caso se utilize apenas uma concentração, é necessário fundamentar esse facto (*cf.* ponto 79). Além disso, a concentração ensaiada deve ser a mais reduzida possível em termos práticos ou técnicos (*ou seja*, sem proximidade ao limite de solubilidade).

Em alguns casos, pode prever-se que a bioconcentração de uma substância seja dependente da concentração da água (por exemplo, no respeitante aos metais, cuja fixação pelos peixes pode ser, pelo menos, parcialmente regulada). Neste caso, é necessário ensaiar pelo menos duas, mas de preferência mais, concentrações (*cf.* ponto 49) relevantes do ponto de vista ambiental. Também para as substâncias cujas concentrações ensaiadas devem estar próximas do limite de solubilidade por motivos práticos, recomenda-se o ensaio de, pelo menos, duas concentrações, pois tal pode contribuir para determinar a fiabilidade das concentrações de exposição. A escolha das concentrações de ensaio deve englobar a concentração realista em termos ambientais, bem como a concentração relevante para efeitos da avaliação específica.

A concentração ou concentrações da substância em estudo seleccionadas devem ser inferiores ao seu nível de efeito crónico ou 1 % da concentração LC_{50} aguda assintótica, num intervalo relevante do ponto de vista ambiental e ocorrer, pelo menos, numa ordem de grandeza superior ao seu limite de quantificação em água pelo método analítico utilizado. A concentração de ensaio mais elevada permitida pode também ser calculada através do quociente de LC_{50} aguda às 96 horas por um rácio de concentração aguda/crónica adequado (por exemplo, os rácios adequados a determinadas substâncias são cerca de três, mas alguns são superiores a 100). Caso se utilize uma segunda concentração, esta deve diferir da anterior por um fator de dez. Caso tal não seja possível devido ao critério de toxicidade (que limita a concentração superior do ensaio) e ao limite analítico (que limita a concentração inferior do ensaio), é possível utilizar um fator inferior a dez e deve ponderar-se a utilização de uma substância com marcação radioativa (de uma grau de pureza elevado, por exemplo, de preferência superior a 98 %). Deve ter-se o cuidado de evitar que a concentração utilizada seja superior ao limite de solubilidade da substância em estudo nos meios de ensaio.

Controlos

Deve realizar-se um controlo de água de diluição ou, se relevante, (*cf.* pontos 30 e 31), um controlo com o solvente, para além da série em ensaio.

Frequência das determinações da qualidade da água

Durante o ensaio, devem determinar-se, em todos os recipientes de ensaio e de controlo, o oxigénio dissolvido, o carbono orgânico total, o pH e a temperatura. A dureza total e a salinidade (se pertinente) devem ser medidas no (s) controlo(s) e num recipiente. Caso sejam ensaiadas duas ou mais concentrações, devem medir-se estes parâmetros numa concentração mais elevada (ou na mais elevada). O oxigénio dissolvido e — se for caso disso — a salinidade devem ser determinados, no mínimo, três vezes durante o período de fixação (no início, na fase intermédia e no final) e com uma frequência semanal no decurso da fase de depuração. O carbono orgânico total deve ser determinado no início do ensaio (48 h e 24 h antes do início), antes da colocação dos peixes nos recipientes e, pelo menos, uma vez por semana no decurso das fases de fixação e de depuração. Deve determinar-se e registar-se a temperatura diariamente, o pH no início e no final de cada período e a dureza uma vez em cada ensaio. Deve determinar-se a temperatura, em contínuo, pelo menos num dos recipientes.

Amostragem e análise dos peixes e da água

Calendário da recolha de amostras de peixes e de água

Devem recolher-se amostras de água para a determinação da concentração da substância em estudo antes da colocação dos peixes nas células, bem como no decurso das fases de fixação e de depuração. Devem recolher-se amostras da água antes da alimentação, em simultâneo com a recolha de amostras de peixes. A recolha de amostras mais frequente pode ser útil para garantir concentrações estáveis após a introdução dos peixes. Durante a fase de fixação, as concentrações da substância em estudo devem ser determinadas de modo a verificar o respeito dos critérios de validade (ponto 24). Caso as análises às amostras de água no início da fase de depuração demonstrem que a substância em estudo não é detetável, isso pode ser utilizado como justificação para não averiguar a ocorrência da substância em estudo na água de controlo e de ensaio durante a restante fase de depuração.

Os peixes devem ser recolhidos em, pelo menos, cinco ocasiões no decurso da fase de fixação e em, pelo menos, quatro ocasiões durante a fase de depuração para averiguar a presença da substância em estudo. Uma vez que, por vezes, se torna difícil efetuar uma estimativa razoavelmente precisa do BCF com base no número de amostras (em especial no caso de a depuração envolver processos que não apresentem uma cinética de primeira ordem nas fases de fixação e depuração) é aconselhável recolher amostras com uma frequência superior, em ambos os períodos (cf. apêndice 4).

Deve determinar-se o teor de lípidos do material biológico utilizado para determinar a concentração da substância em estudo pelo menos no início e no final da fase de fixação e no final da fase de depuração. Caso isto não seja possível, devem recolher-se pelo menos três peixes independentes para amostra, de modo a determinar o teor de lípidos, em cada uma dessas três ocasiões. O número de peixes por tanque no início da experiência deve ser ajustado em conformidade ⁽¹⁾. Em alternativa, caso não se detetem quantidades significativas da substância em estudo nos peixes do lote de controlo (ou seja, peixes da população de reserva), os peixes do lote de controlo do ensaio podem ser analisados apenas no que respeita ao teor de lípidos, podendo a análise da substância em estudo no(s) grupo(s) de ensaio (e a constante de velocidade de fixação, a constante de velocidade de depuração e os valores BCF conexos) ser corrigida em função das alterações de acordo com o teor de lípidos do grupo de controlo durante o ensaio ⁽²⁾.

Não se deve analisar a ocorrência da substância em estudo nem a concentração de lípidos nos peixes mortos ou doentes.

O apêndice 4 apresenta um exemplo de calendário de amostragem. Podem elaborar-se outros calendários mediante a utilização de outros valores do K_{ow} para o cálculo do tempo de exposição necessário a uma fixação de 95 % (consultar o apêndice 5 para cálculos).

Deve prosseguir-se a recolha de amostras durante a fase de fixação até ao surgimento do estado estacionário (ver apêndice 1, definições e unidades) ou à conclusão da fase de fixação (após 28 ou 60 dias, cf. pontos 37 e 38). Antes do início da fase de depuração, os peixes devem ser transferidos para recipientes limpos.

Colheita e preparação das amostras

Devem recolher-se amostras de água para análise, por exemplo, por bombagem através de tubos inertes, a partir de um ponto central na célula de ensaio. No entanto, a centrifugação e a filtração parecem nem sempre separar a fração não biodisponível da fração biodisponível da substância em estudo. Caso se utilize uma técnica de separação, deve apresentar-se sempre uma justificação ou uma validação da mesma no relatório de ensaio, atendendo às dificuldades em matéria de biodisponibilidade (25). Especialmente no que diz respeito às substâncias muito hidrófobas (ou seja, as substâncias com $\log K_{ow} > 5$) (12) (26), cuja adsorção à matriz de filtração ou aos recipientes de centrifugação é possível, as amostras não devem ser submetidas a esses tratamentos. Em vez disso, devem adotar-se medidas para manter as células tão limpas quanto possível (cf. ponto 46) e determinar-se o teor de carbono orgânico total nas fases de fixação e de depuração (cf. ponto 53). Para evitar possíveis problemas com biodisponibilidade reduzida, pode proceder-se à recolha de amostras por técnicas de microextração em fase sólida, no respeitante às substâncias pouco solúveis e muito hidrófobas.

⁽¹⁾ Caso o teor de lípidos e a substância em estudo não seja analisados nos mesmos peixes, os peixes devem, pelo menos, apresentar uma massa semelhante e (se pertinente) o mesmo sexo.

⁽²⁾ Esta alternativa é válida apenas se os peixes em todos os grupos de ensaio forem mantidos em grupos com dimensões semelhantes, se os peixes forem removidos de acordo com o mesmo perfil e alimentados da mesma forma. O que precede assegura que o crescimento dos peixes em todos os grupos de ensaio é semelhante, caso a concentração de ensaio seja inferior ao intervalo tóxico. Se o crescimento for semelhante, espera-se que o teor de lípidos seja igualmente semelhante. Um crescimento diferente no controlo indicaria um efeito da substância e invalidaria o estudo.

Os peixes recolhidos para amostra devem ser eutanasiados instantaneamente, recorrendo ao método mais adequado e humano (para medições com peixes inteiros, não se devem utilizar outros processos que não o enxaguamento com água — cf. ponto 28 — e a secagem). Deve proceder-se à pesagem e medição do comprimento total ⁽¹⁾. Em cada peixe individual, o peso e o comprimento determinados devem ser relacionados com a concentração da substância analisada (e o teor de lípidos, se aplicável), por exemplo, através de um código de identificação único para cada peixe recolhido.

É aconselhável analisar os peixes e a água imediatamente após a recolha das amostras, de modo a evitar eventuais efeitos, nomeadamente devidos à degradação, calculando as constantes de velocidade de fixação e de depuração aproximadas em função do avanço do ensaio. A análise imediata permite também identificar prontamente o início de um estado estacionário.

Caso não se proceda à análise imediata, as amostras devem ser armazenadas por um método adequado. Antes do início do estudo, devem obter-se informações sobre o método adequado de armazenagem da substância em estudo — por exemplo, ultracongelamento, armazenagem a 4 °C, extração, etc. Deve estabelecer-se a duração da armazenagem para garantir que a substância não se degradou durante a mesma.

Qualidade do método analítico

Uma vez que o processo global é determinado essencialmente pela exatidão, precisão e sensibilidade do método analítico utilizado, deve comprovar-se experimentalmente a adequação àquele da exatidão, precisão e reprodutibilidade deste último, bem como do método de recolha da substância em estudo a partir da água e dos peixes. Tal deve ser parte integrante dos testes preliminares. Deve também comprovar-se que a substância em estudo não é detetável na água de diluição. Se necessário, devem corrigir-se os valores da concentração da substância em estudo na água e nos peixes obtidos a partir do ensaio, em função das recuperações e dos valores de fundo dos controlos. As amostras de peixes e de água devem ser manipuladas de modo a minimizar contaminações e perdas, resultantes, nomeadamente, da adsorção pelos equipamentos de amostragem.

Análise das amostras de peixes

Caso se utilizem materiais com marcação radioativa, pode determinar-se a radioatividade total (*isto é*, da substância de origem e dos seus metabolitos) ou, como alternativa, tratar as amostras de modo a que a substância de origem possa ser analisada separadamente. Caso se calcule o BCF com base na substância de origem, devem caracterizar-se os principais metabolitos, no mínimo, no final da fase de fixação (cf. ponto 6). Os principais metabolitos são os que representam ≥ 10 % dos resíduos totais nos tecidos dos peixes, os que representam ≥ 5 % em dois pontos de amostragem consecutivos, os que demonstram níveis crescentes ao longo da fase de fixação e os de risco toxicológico conhecido. Caso o BCF para o peixe inteiro em termos de resíduos totais com marcação radioativa seja ≥ 500 , pode ser recomendável — e, no que se refere a determinadas categorias de substâncias, como pesticidas, muito recomendável — identificar e quantificar os principais metabolitos. A quantificação destes metabolitos pode ser exigida por algumas entidades reguladoras. Caso se identifiquem e quantifiquem produtos de degradação que representem 10 % ou mais dos resíduos totais com marcação radioativa nos tecidos dos peixes, recomenda-se também a identificação e quantificação dos produtos de degradação na água do ensaio. Caso tal não seja possível, deve ser explicado no relatório.

Em geral, deve determinar-se a concentração da substância em estudo para cada peixe pesado. Se tal não for possível, podem combinar-se as amostras em cada amostragem, mas esta combinação limita os procedimentos estatísticos aplicáveis aos dados, pelo que se deve incluir no ensaio um número adequado de peixes para fazer face à combinação, ao procedimento estatístico e à potência desejados. É possível utilizar as referências (27) e (28) como introdução aos procedimentos de combinação pertinentes.

⁽¹⁾ Para além do peso, deve registar-se o comprimento total, já que a comparação do grau de aumento do comprimento durante o ensaio constitui um bom indicador da ocorrência de um efeito adverso.

O BCF deve ser expresso, de forma normalizada, em relação a um peixe com um teor de lípidos de 5 % (com base na massa húmida) para além do obtido diretamente a partir do estudo (cf. ponto 21), a menos que seja possível argumentar que a substância em estudo não se acumula principalmente nos lípidos. Se possível, deve determinar-se o teor de lípidos dos peixes em cada amostragem, de preferência no extrato utilizado para a análise da substância em estudo, uma vez que, com frequência, é necessário remover os lípidos do extrato antes da análise cromatográfica deste último. Porém, a análise das substâncias em estudo exige muitas vezes procedimentos de extração específicos que podem não ser compatíveis com os métodos de ensaio para a determinação dos lípidos. Neste caso — até que se encontrem disponíveis métodos instrumentais não destrutivos adequados —, recomenda-se a utilização de uma estratégia diferente para determinar o teor de lípidos dos peixes (cf. ponto 56). O teor de lípidos deve ser determinado por métodos adequados (20). Como método-padrão (30), pode recomendar-se a extração com clorofórmio/metanol (29), recomendando-se, porém, o método de Smedes (31) como alternativa. Este último método é caracterizado por uma eficiência de extração comparável, elevada exatidão, utilização de solventes orgânicos menos tóxicos e facilidade de execução. Com justificação adequada, podem utilizar-se outros métodos cuja exatidão seja favorável em comparação com os métodos recomendados. É importante apresentar pormenores sobre o método utilizado.

Determinação do crescimento dos peixes

No início do ensaio, é necessário pesar individualmente e determinar o comprimento total de cinco a dez peixes da população de reserva. Estes podem ser os peixes utilizados para a análise aos lípidos (cf. ponto 56). O peso e o comprimento dos peixes utilizados em cada colheita de amostra, tanto do grupo de ensaio como do grupo de controlo, devem ser determinados antes da análise da substância em estudo ou dos lípidos. As medições destes peixes recolhidos podem ser utilizadas para estimar o peso e o comprimento dos peixes que permanecem nos tanques de ensaio e de controlo (cf. ponto 45).

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

A curva de fixação da substância em estudo deve ser obtida através da representação gráfica da respetiva concentração nos peixes ou em determinados tecidos dos mesmos na fase de fixação, em função do tempo, numa escala aritmética. Quando se observar o início do estado estacionário, isto é, quando a curva se tornar aproximadamente assintótica relativamente ao eixo dos tempos, deve calcular-se o BCF (BCF_{ss}) do seguinte modo:

$$\frac{C_f \text{ no estado estacionário (média)}}{C_w \text{ no estado estacionário (média)}}$$

O desenvolvimento de C_f pode ser influenciado pelo crescimento dos peixes (cf. pontos 72 e 73). A concentração de exposição média (C_w) é influenciada por variações ao longo do tempo. É possível prever que uma concentração média ponderada no tempo seja mais relevante e precisa para estudos de bioacumulação, mesmo que a variação se encontre dentro do intervalo de validade adequado (cf. n. 24). É possível calcular a concentração média da água ponderada ao longo do tempo (TWA) em conformidade com o apêndice 5, secção 1.

O fator de bioconcentração cinético (BCF_k) consiste no quociente das duas constantes de velocidade cinéticas de primeira ordem, k_1/k_2 . É possível obter as constantes de velocidade k_1 e k_2 e o BCF_k através do ajustamento simultâneo das fases de fixação e de depuração. Em alternativa, as constantes k_1 e k_2 podem ser determinadas sequencialmente (ver apêndice 5 para uma descrição e comparação destes métodos). Pode ser necessário corrigir a constante de velocidade de depuração (k_2) em função da diluição de crescimento (cf. pontos 72 e 73). Se a curva de fixação e/ou depuração revelar de modo inequívoco que o processo não segue uma cinética de primeira ordem, há que recorrer a modelos mais complexos (ver referências no apêndice 5), solicitando o parecer de um perito em bioestatística ou farmacocinética.

Dados sobre o peso/comprimento dos peixes

A massa húmida e o comprimento total de cada peixe em todos os intervalos de amostragem são apresentados separadamente sob a forma de um quadro, no respeitante aos grupos de ensaio e de controlo durante as fases de fixação (incluindo a população de reserva no início da fixação) e de depuração. Em cada peixe individual, o peso e o comprimento determinados devem ser relacionados com a concentração química analisada, por exemplo, através de um código de identificação único para cada peixe recolhido. O peso é a medida de crescimento preferível para efeitos de correção dos valores do BCF cinético em função da diluição de crescimento (ver o ponto 73 e o apêndice 5 no respeitante ao método utilizado para corrigir os dados em função da diluição de crescimento).

Correção em função da diluição de crescimento e normalização de lípidos

O crescimento dos peixes durante a fase de depuração pode reduzir as concentrações químicas medidas nos peixes, tornando a constante de velocidade de depuração global (k_2) superior à que se verificaria apenas nos processos de remoção (por exemplo, respiração, metabolismo, defecação). Os fatores de bioconcentração cinéticos devem ser corrigidos em função da diluição de crescimento. Um BCF_{ss} também será influenciado pelo crescimento, mas não existe nenhum procedimento acordado para corrigir um BCF_{ss} em função do crescimento. Nos casos de crescimento significativo, também se deve calcular o BCF_k , corrigido em função do crescimento (BCF_{kg}), uma vez que pode ser uma determinação mais relevante do fator de bioconcentração. Na prática, o teor de lípidos dos peixes de ensaio (que se encontra fortemente associado à bioacumulação de substâncias hidrófobas) pode variar o suficiente para tornar necessário o estabelecimento de um determinado teor de lípidos normalizado nos peixes (5 % p/p), de modo a apresentar os fatores de bioconcentração cinéticos e no estado estacionário de forma significativa, a menos que seja possível alegar que a substância em estudo não se acumula sobretudo nos lípidos (por exemplo, algumas substâncias perfluoradas pode ligar-se às proteínas). O apêndice 5 apresenta equações e exemplos destes cálculos.

Para corrigir um BCF cinético em função da diluição de crescimento, deve corrigir-se a constante de velocidade de depuração em função do crescimento. A constante corrigida (k_{2g}) é calculada através da subtração da constante de velocidade de crescimento (k_g , obtida a partir dos dados relativos ao peso determinado) à constante de velocidade de depuração global (k_2). O fator de bioconcentração cinético corrigido em função do crescimento é posteriormente calculado dividindo a constante de velocidade de fixação (k_1) pela constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento (k_{2g}) (cf. apêndice 5). Em alguns casos, esta metodologia não é muito adequada. Por exemplo, no que diz respeito às substâncias que depuram muito lentamente, ensaiadas em peixes de crescimento rápido, o valor k_{2g} obtido pode ser muito reduzido e, deste modo, o erro nas duas constantes de velocidade utilizadas para o seu cálculo torna-se crítico e, em alguns casos, as estimativas do valor kg podem ser superiores a k_2 . Uma metodologia alternativa, que contorna a necessidade da correção em função da diluição de crescimento, implica a utilização de dados de depuração relativos à massa da substância em estudo por peixe (com base no peixe inteiro), ao invés dos dados (de concentração) relativos à massa normal da substância em estudo por unidade de massa de peixe. Isso não apresenta dificuldades, uma vez que os ensaios realizados por este método devem relacionar as concentrações registadas nos tecidos com o peso de cada peixe. O procedimento simples para realizar o que precede encontra-se descrito no apêndice 5. Todavia, importa salientar a necessidade de registar o parâmetro k_2 mesmo em caso de utilização desta metodologia alternativa.

Também se devem registar os fatores de bioconcentração cinéticos e no estado estacionário relativos a um teor de lípidos por defeito, por peixe, de 5 % (p/p), a menos que seja possível argumentar que a substância em estudo não se acumula essencialmente nos lípidos. Os dados relativos à concentração nos peixes, ou o BCF, são normalizados de acordo com a razão entre 5 % e o teor médio de lípidos (individual) real (em % de massa húmida) (cf. apêndice 5).

Caso se tenham realizado análises à substância em estudo e aos lípidos nos mesmos peixes, devem utilizar-se os dados normalizados relativos aos lípidos para cada peixe para calcular um BCF normalizado em função dos lípidos. Em alternativa, se o crescimento no lote de peixes de controlo e no lote de peixes expostos for semelhante, pode utilizar-se apenas o teor de lípidos dos peixes do lote de controlo para efeitos de correção em função dos lípidos (cf. ponto 56). Encontra-se descrito no apêndice 5 um método de cálculo de um BCF normalizado em função dos lípidos.

Interpretação dos resultados

Sempre que as concentrações das soluções de ensaio sejam próximas do limite de deteção do método analítico utilizado, os resultados devem ser interpretados com precaução.

Para excluir efeitos tóxicos, o crescimento médio nos grupos de ensaio e de controlo não deve, em princípio, ser significativamente diferente. As constantes de velocidade de crescimento ou as curvas de crescimento dos dois grupos devem ser comparadas por um procedimento adequado ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ É possível efetuar um teste *t* às constantes de velocidade de crescimento, de modo a determinar se o crescimento difere entre os grupos de ensaio e de controlo, ou um teste *F* em caso de análise da variância. Se necessário, é possível utilizar um teste *F* ou um teste de rácio da verosimilhança para ajudar na seleção do modelo de crescimento adequado (monografia da OCDE, 54, (32)).

A obtenção de curvas de fixação e de depuração bem definidas constitui um indicador da qualidade dos dados relativos à bioconcentração. No que se refere às constantes de velocidade, o resultado de um teste de adequação do ajustamento χ^2 deve demonstrar um bom ajustamento — ou seja, uma percentagem reduzida de erro de medição (32) — para o modelo de bioacumulação, de modo a que as constantes de velocidade possam ser consideradas fiáveis (cf. apêndice 5). Caso se utilize mais do que uma concentração de ensaio, a variação nas constantes de fixação/depuração entre as concentrações de ensaio deve ser inferior a 20 % ⁽¹⁾. Em caso negativo, poderá indicar-se a dependência da concentração. Devem registar-se as diferenças significativas observadas nas constantes de velocidade de fixação/depuração entre as concentrações de ensaio aplicadas e devem apresentar-se possíveis explicações. O intervalo de confiança de 95 % dos valores de BCF obtidos em estudos adequados é, em geral, da ordem de ± 20 % do BCF obtido.

Caso sejam ensaiadas duas ou mais concentrações, os resultados de ambas ou todas as concentrações são utilizados para examinar se os resultados são coerentes e para demonstrar se existe dependência da concentração. Caso se ensaie apenas uma concentração, com o objetivo de minimizar a utilização de animais e/ou de recursos, é necessário fundamentar esse facto.

O BCF_{ss} resultante é duvidoso se o BCF_k for significativamente mais elevado do que o BCF_{ss}, uma vez que tal pode indicar que não se atingiu um estado estacionário ou que a diluição de crescimento e os processos de depuração não foram tidos em conta. Nos casos em que o parâmetro BCF_{ss} é muito superior a BCF_k, deve averiguar-se a ocorrência de erros no cálculo das constantes de velocidade de fixação e de depuração e proceder-se à sua reavaliação. O recurso a um processo de ajustamento diferente pode melhorar a estimativa do BCF_k (cf. apêndice 5).

Relatório de ensaio

Para além das informações sobre a substância em estudo indicadas no ponto 3, o relatório de ensaio deve incluir as seguintes informações:

Substância em estudo:

Natureza física e propriedades físico-químicas pertinentes;

- Dados de identificação química, tais como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou INChI, fórmula estrutural, grau de pureza, identidade química das impurezas conforme adequado e possível na prática, etc. (incluindo o teor de carbono orgânico, se adequado).
- No que diz respeito às substâncias formadas por vários componentes e UVCB (substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos e materiais biológicos), a descrição — na medida do possível — da identidade química de cada componente e, para cada um, a sua percentagem face à massa total da substância. Deve resumir-se de que modo o método analítico utilizado no ensaio reflete uma medida da concentração da substância; todos os procedimentos analíticos devem ser descritos, nomeadamente a exatidão do método, o seu limite de deteção e o limite de quantificação.
- Em caso de recurso à marcação radioativa, a posição do(s) átomo(s) substituído(s) e a percentagem de radioatividade associada às impurezas.
- Informações sobre a toxicidade da substância em estudo para os peixes (idealmente para a espécie de ensaio). A toxicidade deve ser registada como LC₅₀ aguda às 96 horas e NOAEC e LOAEC de um estudo crónico (ou seja, um ensaio nas fases iniciais de vida ou um ensaio sobre o ciclo de vida completo, se disponível).
- Condições de armazenagem do produto químico ou da substância em estudo e estabilidade do mesmo, ou da mesma, nessas condições, caso se proceda à armazenagem antes da utilização.

Espécie de ensaio:

Denominação científica, variedade, origem, pré-tratamento eventual, aclimação, idade, sexo (se pertinente), gama de dimensões (peso e comprimento), etc.

⁽¹⁾ Estas percentagens pressupõem que os métodos analíticos são fiáveis e que a semivida é < 14 dias. Se os métodos analíticos forem menos fiáveis ou a semivida aumentar (significativamente), estes números tornar-se-ão mais elevados.

Condições de ensaio:

- Tipo de procedimento utilizado (por exemplo, ensaio dinâmico ou semiestático); estudo normal ou conceção minimizada, incluindo lógica subjacente e justificação.
- Tipo e características da iluminação utilizada e respetivo fotoperíodo.
- Conceção do ensaio (número e dimensões das células de ensaio, taxa de renovação do volume de água, taxa de carga, número de replicados, número de peixes por replicado, número de concentrações de ensaio, duração das fases de fixação e depuração, frequência de amostragem de peixes e de água).
- Método de preparação das soluções de reserva e frequência de renovação (caso se utilize um solvente, deve fornecer-se a respetiva concentração, bem como a contribuição do mesmo para o teor de carbono orgânico da água), ou descrição do sistema de dosagem alternativo.
- Concentrações de ensaio nominais, média e desvio-padrão dos valores determinados nos recipientes de ensaio e método e frequência de obtenção dos mesmos.
- Fonte de água de diluição, descrição do eventual pré-tratamento desta última, resultados de quaisquer ensaios destinados a comprovar a adequação da água aos peixes e características da água: pH, dureza, temperatura, concentração de oxigénio dissolvido, cloro residual (se determinado), carbono orgânico total, sólidos em suspensão, salinidade (se adequado) e quaisquer outras determinações efetuadas.
- Qualidade da água nos recipientes de ensaio (pH, dureza, carbono orgânico total, temperatura e concentração de oxigénio dissolvido); métodos utilizados e frequência das medições.
- Informações pormenorizadas sobre a alimentação dos animais — p. ex., tipo de alimentos, origem e composição dos mesmos (se possível, apresentar, pelo menos, o respetivo teor de lípidos e proteínas), taxa de alimentação selecionada, quantidade fornecida e frequência;
- Informações sobre o tratamento das amostras de peixes e de água, incluindo pormenores relativos à preparação, armazenagem e extração, bem como métodos analíticos aplicados à substância em estudo e à determinação do teor de lípidos, incluindo a respetiva precisão.
- Métodos utilizados para a aleatorização do tratamento e distribuição dos peixes pelos recipientes de ensaio.
- Data de introdução dos organismos de ensaio nas soluções de ensaio e duração do ensaio.
- Descrição dos ensaios de determinação da gama de concentrações e resultados, se disponível.

Resultados:

- Resultados de quaisquer estudos preliminares efetuados.
- Mortalidade dos peixes do lote de controlo e dos peixes expostos à substância, bem como qualquer comportamento anormal observável.
- Informações sobre quaisquer efeitos adversos observados.
- Descrição completa de todos os procedimentos de análise química utilizados, nomeadamente limites de deteção e quantificação, variabilidade e recuperação.
- Teor de lípidos dos peixes, nomeadamente o método utilizado para a sua determinação e, se calculado, o fator de normalização em função dos lípidos (L_n , fator que expressa resultados relativos a um teor de lípidos dos peixes de 5 %).
- Quadro com os dados respeitantes ao peso — e ao comprimento — dos peixes, relacionados com as concentrações do produto químico (e o teor de lípidos, se pertinente) de cada peixe, para os grupos de controlo e de exposição (por exemplo, utilizando identificadores únicos para cada peixe recolhido) e cálculos relativos à(s) constante(s) de velocidade de crescimento obtida(s).
- Quadros com dados sobre a concentração da substância em estudo nos peixes (C_p , relacionados com cada peixe) e na água (C_w), com valores médios para o grupo de ensaio e de controlo, desvio-padrão e gama, se adequado, para todos os tempos de amostragem (C_f expressa em mg/kg de massa húmida do corpo inteiro ou de tecidos especificados do mesmo, por exemplo, lípidos, e C_w em mg/l). Valores C_w relativos às séries de controlo (bem como as concentrações de fundo).

- Curvas — incluindo todos os dados determinados — que demonstrem o seguinte (se pertinente, as concentrações podem ser expressas em relação ao corpo inteiro e o teor de lípidos normalizado para 5 % do animal ou para determinados tecidos do mesmo):
 - Crescimento, *ou seja*, peso do peixe em função do tempo ou logaritmo natural do peso em função do tempo (incluindo a constante de velocidade de crescimento obtida, k_g);
 - Fixação e depuração da substância em estudo nos peixes (na forma de gráfico);
 - Surgimento do estado estacionário (se pertinente);
 - Logaritmo natural da concentração em função do tempo de fixação (incluindo a constante de velocidade de fixação obtida k_1);
 - Logaritmo natural da concentração em função do tempo de depuração (incluindo a constante de velocidade de depuração obtida k_2); e
 - Curvas das fases de fixação e depuração que demonstram os dados e o modelo ajustado.
- Se uma inspeção visual de uma representação gráfica revelar valores anómalos evidentes, é possível aplicar um teste estatisticamente válido a estes valores, para eliminar dados espúrios e apresentar uma justificação documentada para a sua omissão.
- Fator de bioconcentração do estado estacionário (BCF_{ss}), caso quase se atinja o estado estacionário.
- Fator de bioconcentração cinético (BCF_k) e constantes de velocidade de fixação e de depuração obtidas, k_1 e k_2 , em conjunto com as variâncias de k_2 (declive e ordenada na origem) caso se utilize ajustamento sequencial.
- Intervalos de confiança, desvio-padrão (conforme disponível) e métodos de cálculo/análise de dados para cada parâmetro para cada concentração da substância em estudo utilizada.
- Quaisquer informações relativas aos metabolitos da substância em estudo com marcação radioativa e à respetiva acumulação.
- A(s) constante(s) de velocidade de crescimento (incluindo intervalo(s) de confiança de 95 %) e a constante de velocidade de depuração calculada, corrigida em função do crescimento (k_{2g}), a semivida e o BCF (BCF_{kg}).
- Devem referir-se quaisquer ocorrências especiais registadas no decurso do ensaio, bem como quaisquer desvios relativamente ao procedimento ou outras informações de relevo.
- Um quadro recapitulativo dos dados calculados e medidos pertinentes, como:

Constantes de velocidade de fixação e de depuração da substância e fatores de bioconcentração (BCF)	
k_g (constante de velocidade de crescimento; dia^{-1}):	Inserir valor (IC 95 %) ⁽¹⁾
k_1 (constante de velocidade de fixação global; $\text{l kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$):	Inserir valor (IC 95 %) ⁽¹⁾
k_2 (constante de velocidade de depuração global; dia^{-1}):	Inserir valor (IC 95 %) ⁽¹⁾
k_{2g} (constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento; dia^{-1}):	Inserir valor (IC 95 %) ⁽¹⁾
C_f (concentração do produto químico nos peixes em estado estacionário; mg kg^{-1}):	Inserir valor $\pm$ SD ⁽²⁾
C_w (concentração do produto químico na água; mg l^{-1}):	Inserir valor $\pm$ SD ⁽²⁾
L_n (fator de normalização dos lípidos):	Inserir valor ⁽³⁾

Constantes de velocidade de fixação e de depuração da substância e fatores de bioconcentração (BCF)	
BCF _{ss} (BCF do estado estacionário; l kg ⁻¹)	Inserir valor ± SD ⁽²⁾
BCF _{ssl} (BCF do estado estacionário normalizado em função dos lípidos; l kg ⁻¹):	Inserir valor ⁽³⁾ ± SD ⁽²⁾
BCF _k (BCF cinético; l kg ⁻¹)	Inserir valor (IC 95 %) ⁽¹⁾
BCF _{kg} (BCF cinético corrigido em função do crescimento; l kg ⁻¹)	Inserir valor (IC 95 %) ⁽¹⁾
t _{1/2g} (semivida corrigida em função do crescimento; dia):	Inserir valor (IC 95 %) ⁽¹⁾
BCF _{kl} (BCF cinético normalizado em função dos lípidos; l kg ⁻¹):	Inserir valor
BCF _{klg} (BCF cinético corrigido em função do crescimento e normalizado em função dos lípidos; l kg ⁻¹):	Inserir valor
⁽¹⁾ IC: intervalo de confiança (sempre que a estimativa seja possível) ⁽²⁾ SD: Desvio-padrão (sempre que a estimativa seja possível)	

Deve evitar-se registar resultados como «não detetados/quantificados no limite de deteção/quantificação» mediante o desenvolvimento de um método e de um protocolo experimental preliminares, uma vez que esses resultados não podem ser utilizados para o cálculo das constantes de velocidade.

C.13 — II Ensaio minimizado de exposição aquosa em peixes

INTRODUÇÃO

A experiência crescente adquirida na realização e interpretação do ensaio completo, tanto por laboratórios como por entidades reguladoras, demonstra que — com algumas exceções — é aplicável uma cinética de primeira ordem à estimativa das constantes de velocidade de fixação e de depuração. É, pois, possível estimar as constantes de velocidade de fixação e de depuração com um número mínimo de pontos de amostragem e obter o BCF cinético.

O objetivo inicial do exame de conceções alternativas para estudos do BCF consistiu em desenvolver um ensaio minimizado a utilizar numa fase intermédia, para refutar ou confirmar as estimativas do BCF com base no K_{ow} e na ferramenta QSAR e eliminar, desse modo, a necessidade de um estudo completo para muitas substâncias, bem como em minimizar os custos e a utilização de animais através da recolha de menos amostras e da redução do número de sequências analíticas realizadas. Seguindo a principal conceção do método de ensaio anterior para permitir a integração dos resultados do ensaio com os dados existentes relativos ao BCF, e de modo a facilitar o desempenho do ensaio e a interpretação dos dados, o objetivo consiste em apresentar estimativas do BCF de exatidão e precisão adequadas para a tomada de decisões em matéria de avaliação de riscos. São válidos muitos dos mesmos pressupostos que no ensaio completo, no que respeita, p. ex., aos critérios de validade (cf. ponto 24) e à interrupção do ensaio caso se verifique uma fixação insignificante no final da fase de fixação (cf. pontos 16 e 38).

As substâncias elegíveis para o ensaio de conceção minimizada devem pertencer ao domínio geral para o qual o método de ensaio foi desenvolvido, ou seja, substâncias orgânicas não polares (cf. ponto 49). Caso existam indícios de que a substância a ensaiar poderá apresentar um comportamento diferente (por exemplo, um desvio claro de uma cinética de primeira ordem), deve realizar-se um ensaio completo, para fins regulamentares.

Normalmente, a duração do ensaio minimizado não é mais curta do que a do ensaio normal do BCF, mas utiliza-se uma amostra de peixes mais reduzida (ver fundamentação no apêndice 6). Todavia, o período de depuração pode ser reduzido no caso de substâncias com depuração rápida, para evitar a ocorrência de concentrações nos peixes inferiores ao limite de detecção/quantificação antes do final do ensaio. Para determinar a necessidade da realização de um ensaio completo, é possível utilizar um ensaio de exposição de tipo minimizado em peixes com uma única concentração; se os dados resultantes utilizados para calcular as constantes de velocidade e o BCF forem sólidos (cf. ponto 93), o ensaio completo é dispensável caso o BCF resultante não se aproxime de valores regulamentares críticos.

Em alguns casos, pode ser vantajoso realizar um ensaio preliminar de conceção minimizada com mais do que uma concentração, para determinar se as estimativas do BCF para a substância dependem da concentração. Se for o caso, será necessário realizar o ensaio completo. Se o ensaio minimizado demonstrar que as estimativas do BCF não dependem da concentração mas os resultados não forem considerados definitivos, é possível executar qualquer ensaio completo subsequente com uma única concentração, reduzindo assim a utilização de animais em comparação com um teste completo com duas (ou mais) concentrações.

As substâncias potencialmente elegíveis para o ensaio minimizado devem:

- Ser suscetíveis de apresentar, aproximadamente, uma cinética de fixação e de depuração de primeira ordem, por exemplo, decorrente de um método comparativo com substâncias semelhantes;
- Apresentar $\log K_{ow} < 6$, a menos que se preveja um metabolismo rápido ⁽¹⁾;
- Ser suficientemente solúveis em água, atendendo à técnica analítica (cf. ponto 24);
- Ser claramente quantificáveis (*isto é*, as concentrações devem ser, pelo menos, de uma ordem de grandeza superior ao limite de quantificação), tanto nos peixes como na água; recomenda-se o recurso à marcação radioativa (cf. ponto 23); e
- Ter um período de depuração superior à respetiva semivida prevista (cf. apêndice 5 para cálculos), sem o que a duração da depuração deve ser ajustada em conformidade (cf. ponto 91). Permite-se uma exceção a esta regra caso se preveja que a substância tenha um metabolismo rápido.

CALENDÁRIO DE AMOSTRAGEM PARA ESTUDOS QUE SEGUEM A CONCEÇÃO MINIMIZADA

Recolha de amostras de peixes

A recolha de amostras de peixes é reduzida a quatro pontos de amostragem:

- A meio e no final da fase de fixação (sendo a última igualmente o início da fase de depuração), por exemplo, após 14 e 28 dias (33).
- A meio da fase de depuração e no final do estudo (no qual a concentração da substância é $< 10\%$ da concentração máxima ou, pelo menos, a um tempo claramente superior à semivida da substância), p. ex., após 7 e 14 dias de depuração (33). Caso se preveja ou observe uma depuração rápida, pode ser necessário reduzir o período de depuração para evitar concentrações inferiores ao limite de quantificação nos peixes.
- Medição de lípidos: idêntica ao estudo completo.
- Correção em função do crescimento, tal como no estudo completo.
- BCF: calculado como BCF cinético.

Recolha de amostras de água

Na conceção minimizada, as amostras de água são recolhidas como no estudo completo (cf. ponto 54) ou, pelo menos, cinco vezes, igualmente divididas durante a fase de fixação e semanalmente na fase de depuração.

⁽¹⁾ Com efeito, o ensaio minimizado pode ser utilizado para demonstrar um metabolismo rápido sempre que se saiba que o mesmo é provável.

Alterações à conceção

Atendendo às propriedades da substância em estudo, às previsões QSAR válidas e ao objetivo específico do estudo, é possível ponderar algumas alterações à conceção do mesmo:

- Caso seja necessária uma precisão mais elevada, é possível utilizar mais peixes (6 ou 8 em vez de 4) para a amostra no final da fase de fixação.
- Deve incluir-se um grupo «adicional» de peixes se, aos 14 dias — ou no final previsto da fase de depuração — esta última não tiver atingido um nível adequado (*ou seja*, > 50 %). Caso a duração prevista da fase de depuração for inferior ou superior a 14 dias, o calendário de amostragem deve ser adaptado (*ou seja*, um grupo de peixes no final previsto da fase de depuração e um grupo após metade desse período).
- Devem utilizar-se duas concentrações de ensaio para explorar uma possível dependência da concentração. Caso os resultados do ensaio minimizado, realizado com duas concentrações de ensaio, demonstrem que o BCF não depende da concentração (*ou seja*, difere menos de 20 %), uma concentração de ensaio pode ser considerada suficiente num ensaio completo, se for realizado.
- É provável que seja possível utilizar modelos de processos de bioacumulação como os propostos por Arnot *et al.* (35) para assistir no planeamento da duração das fases de fixação e de depuração (ver também o apêndice 5).

Cálculos

A fundamentação subjacente a esta metodologia é que o fator de bioconcentração num ensaio completo pode ser determinado como fator de bioconcentração do estado estacionário (BCF_{ss}), através do cálculo do rácio entre a concentração da substância em estudo nos tecidos dos peixes e a concentração da substância em estudo na água, ou mediante o cálculo do fator de bioconcentração cinético (BCF_k) como rácio entre a constante de velocidade de fixação k_1 e a constante de velocidade de depuração k_2 . O BCF_k é válido mesmo que não se alcance a concentração da substância no estado estacionário durante a fixação, desde que esta última e a depuração sigam aproximadamente processos de cinética de primeira ordem. Como mínimo absoluto, são necessários dois valores para estimar as constantes de velocidade de fixação e de depuração, um no final da fase de fixação (*ou seja*, no início da fase de depuração) e um no final (ou após uma parte significativa) da fase de depuração. Recomenda-se um ponto de amostragem intermédio como verificação da cinética de fixação e de depuração (¹). Para cálculos, ver apêndices 5 e 6.

Interpretação dos resultados

Para avaliar a validade e o valor informativo do ensaio, deve verificar-se que o período de depuração excede uma semivida. Além disso, deve comparar-se o BCF_{km} (BCF cinético decorrente de um ensaio minimizado) com o valor do BCF_{ss} minimizado (que é o BCF_{ss} calculado no final da fase de fixação, pressupondo o surgimento do estado estacionário. O que precede é apenas um pressuposto, já que o número de pontos de amostragem não é suficiente para o provar). Se $BCF_{km} < BCF_{ss}$ minimizado, este último é o valor preferível. Se BCF_{km} for inferior a 70 % do BCF_{ss} minimizado, os resultados não são válidos e deve realizar-se um ensaio completo.

Caso o BCF_{km} obtido no ensaio minimizado seja próximo de um valor regulamentar crítico, deve realizar-se um ensaio completo. Caso contrário (valor muito superior ou inferior aos valores regulamentares críticos), pode não ser necessário realizar um ensaio completo; se exigido pelo quadro regulamentar aplicável, pode realizar-se um ensaio completo com uma única concentração.

Caso se considere, após um ensaio minimizado com uma concentração, que é necessário um ensaio completo, este pode ser executado com uma segunda concentração. Se os resultados forem coerentes, é possível dispensar um ensaio completo adicional com uma concentração diferente, já que não se prevê que a bioconcentração da substância dependa da concentração. Se o ensaio minimizado tiver sido realizado com duas concentrações e os resultados não demonstrarem qualquer dependência da concentração, é possível executar o ensaio total com uma única concentração (*cf.* ponto 87).

(¹) Quando são medidos apenas dois valores, é possível obter estimativas dos intervalos de confiança para o BCF_{km} mediante uma técnica de estimativa da variância. Quando também se encontram disponíveis valores intermédios, é possível calcular intervalos de confiança para o BCF_{km} como no teste completo.

Relatório de ensaio

O relatório do ensaio minimizado deve incluir todas as informações exigidas para o ensaio completo (*cf.* ponto 81), exceto aquelas cuja obtenção não é possível (*ou seja*, uma curva que demonstre o surgimento do estado estacionário e o fator de bioconcentração do estado estacionário; neste último caso, deve apresentar-se, em vez disso, o BCF_{ss} minimizado). Deve também incluir os fundamentos para a utilização do ensaio minimizado e o BCF_{km} resultante.

C.13 — III Ensaio de bioacumulação com exposição por via alimentar em peixes

INTRODUÇÃO

Deve utilizar-se o método descrito na presente secção para substâncias relativamente às quais a metodologia da exposição aquosa não é viável (por exemplo, por não ser possível manter concentrações estáveis e determináveis na água nem atingir cargas corporais adequadas em 60 dias de exposição; ver secções anteriores sobre o método de exposição aquosa). Contudo, é necessário estar consciente de que o parâmetro do presente ensaio é um fator de bioamplificação por via alimentar (BMF) em vez de um fator de bioconcentração (BCF) ⁽¹⁾.

Na conferência SETAC-Europe realizada em Madrid em maio de 2001, foi apresentado um novo método para a realização de ensaios de bioacumulação de substâncias orgânicas pouco solúveis em água (36). Este trabalho baseou-se em vários estudos de bioacumulação relatados na literatura que utilizam um método de dosagem com alimentação enriquecida — vide, *por exemplo*, (37). No início de 2004, foi apresentado a um grupo de trabalho da UE sobre substâncias PBT um projeto de protocolo (38) destinado a determinar o potencial de bioacumulação de substâncias orgânicas pouco solúveis em água às quais o método normal de bioconcentração com exposição aquosa não era aplicável, juntamente com um documento de base de apoio (39). Uma das justificações adicionais apresentadas para o método foi que a exposição potencial por via do ambiente a estas substâncias pouco solúveis ($\log K_{ow} > 5$) pode ocorrer, em larga escala, através da alimentação (*cf.* (40) (41) (42) (43) (44)). Por este motivo, os ensaios de exposição por via alimentar são mencionados em alguns regulamentos relativos aos produtos químicos ⁽²⁾. Todavia, note-se que o método descrito evita cuidadosamente a exposição através da fase aquosa, pelo que não é possível comparar diretamente um BMF decorrente do presente método de ensaio com um BMF obtido por meio de um estudo de campo (no qual é possível combinar as exposições aquosa e por via alimentar).

A presente secção do método de ensaio baseia-se nesse protocolo (38) e constitui um novo método que não constava da anterior versão do método C.13. Este ensaio alternativo permite que a via de exposição alimentar seja diretamente analisada em condições laboratoriais controladas.

Os investigadores interessados devem consultar os pontos 1 a 14 do presente método de ensaio para informações sobre as circunstâncias em que o ensaio de exposição por via alimentar pode ser preferível ao ensaio de exposição por via aquosa. Apresentam-se informações sobre vários aspetos relativos às substâncias, que devem ser tidos em conta antes da realização de um ensaio.

Pode ponderar-se a utilização de substâncias com marcação radioativa com uma fundamentação semelhante às do método de exposição aquosa (*cf.* pontos 6 e 65).

É possível utilizar o método por via alimentar para ensaiar mais do que uma substância num único ensaio, desde que se cumpram determinados critérios, referidos de forma mais pormenorizada no ponto 112. Neste caso, por motivos de simplicidade, o método descreve um ensaio com apenas uma substância em estudo.

O ensaio por via alimentar é semelhante ao método de exposição aquosa em muitos aspetos, com a exceção evidente da via de exposição. Assim, muitos aspetos do método aqui descrito sobrepõem-se ao método de exposição por via aquosa descrito na secção anterior. Na medida do possível, apresentam-se referências cruzadas para os números pertinentes na secção anterior, mas, no interesse da facilidade de leitura e da compreensão, são inevitáveis algumas duplicações.

⁽¹⁾ Ver apêndice 1 para definições e unidades

⁽²⁾ Para efeitos do Regulamento (CE) n.º 1907/2006 relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição de produtos químicos (REACH) (JO L 396 de 30.12.2006, p. 1), esta questão é abordada no documento *Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment*, capítulo R.7c, R.7.10.3.1; R.7.10.4.1; figura R7.10-2.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

Podem utilizar-se condições dinâmicas ou semiestáticas (cf. ponto 4); recomendam-se as condições dinâmicas para limitar a potencial exposição da substância em estudo através da água em resultado de qualquer dessorção dos alimentos enriquecidos ou das fezes. O ensaio compreende duas fases: fixação (substância em estudo-alimentação enriquecida) e depuração (alimentação limpa, sem tratamento) — cf. ponto 16. Na fase de fixação, um grupo de peixes de ensaio é alimentado, diariamente, com uma dieta constituída por alimento comercial para peixes, de composição conhecida, enriquecido com a substância em estudo. Idealmente, os peixes devem consumir todo o alimento oferecido (cf. ponto 141). De seguida, são alimentados com alimento comercial para peixes não tratado durante a fase de depuração. No que respeita ao método de exposição por via aquosa, é possível utilizar, se necessário, mais do que um grupo de ensaio com diferentes concentrações da substância em estudo; porém, para a maioria das substâncias orgânicas muito hidrófobas, um grupo de ensaio é suficiente (cf. pontos 49 e 107). Caso se utilizem condições semiestáticas, os peixes devem ser transferidos para um novo meio e/ou uma nova célula de ensaio no final da fase de fixação, se o meio e/ou o equipamento utilizados na fase de fixação tiverem sido contaminados com a substância em estudo por lixiviação. As concentrações da substância em estudo nos peixes são determinadas em ambas as fases do ensaio. Para além do grupo de peixes alimentado com a dieta enriquecida (grupo de ensaio), mantém-se um grupo de peixes de controlo em condições idênticas, sendo os animais alimentados de modo idêntico, com a exceção de o alimento comercial para peixes não ser enriquecido com a substância em estudo. Este grupo de controlo permite a quantificação dos níveis de fundo da substância em estudo nos peixes não expostos e serve de comparação para quaisquer efeitos adversos, relacionados com o tratamento, observados no(s) grupo(s) de ensaio ⁽¹⁾. Além disso, permite a comparação das constantes de velocidade de crescimento entre grupos, para verificar que foram consumidas quantidades semelhantes da dieta oferecida (na explicação das diferenças entre as constantes de velocidade de crescimento, devem também ser tidas em conta eventuais diferenças na palatabilidade das dietas; cf. ponto 138). É importante que, tanto na fase de fixação como na de depuração, sejam fornecidas aos grupos de ensaio e de controlo dietas equivalentes em termos nutricionais.

De acordo com a experiência dos criadores do método, uma fase de fixação compreendida entre 7 e 14 dias é, em geral, suficiente (38) (39). Este intervalo deve minimizar o custo da realização do ensaio, continuando a garantir uma exposição suficiente à maioria das substâncias. Contudo, em alguns casos, a fase de fixação pode ser prolongada (cf. ponto 127). Durante a fase de fixação, a concentração da substância nos peixes pode não atingir o estado estacionário, pelo que os resultados e o tratamento dos dados decorrentes deste método se baseiam, em regra, numa análise cinética dos resíduos presentes nos tecidos. (Nota: Neste caso, bem como no ensaio de exposição aquosa, é possível aplicar as equações para a estimativa do surgimento do estado estacionário — ver apêndice 5). A fase de depuração tem início quando os peixes são pela primeira vez alimentados com uma dieta não enriquecida e, em geral, a sua duração é de, no máximo, 28 dias, ou até que deixe de ser possível quantificar a substância em estudo no peixe inteiro, consoante o que ocorrer primeiro. A fase de depuração pode ser reduzida ou prolongada para além de 28 dias, consoante a evolução das concentrações químicas determinadas e da dimensão dos peixes com o tempo.

Este método permite a determinação da semivida específica da substância ($t_{1/2}$), a partir da constante de velocidade de depuração, k_d), da eficiência de assimilação (absorção intestinal; a), do fator de bioamplificação cinético por via alimentar (BMF_K), do fator de bioamplificação cinético por via alimentar, corrigido em função do crescimento (BMF_{K_g}), e do fator de bioamplificação cinético por via alimentar, corrigido em função dos lípidos ⁽²⁾ (BMF_{K_L}) (e/ou do fator de bioamplificação cinético por via alimentar corrigido em função do crescimento e dos lípidos, $BMF_{K_{g/L}}$), para a substância em estudo, nos peixes. No que diz respeito ao método de exposição aquosa, o aumento da massa dos peixes durante o ensaio resultará na diluição da substância em estudo no peixe em crescimento e, como tal, o BMF (cinético) será subestimado se não for corrigido em função do crescimento (cf. pontos 162 e 163). Além disso, caso se considere que se atingiu o estado estacionário na fase de fixação, é possível calcular um BMF indicativo do estado estacionário. Encontram-se disponíveis metodologias que tornam possível estimar um fator de bioconcentração cinético (BCF_K) a partir de dados gerados no estudo relativo à via alimentar (por exemplo, (44) (45) (46) (47) (48)). As vantagens e desvantagens destas metodologias são debatidas no apêndice 8.

O ensaio foi concebido sobretudo para substâncias orgânicas não polares pouco solúveis que, nos peixes, seguem aproximadamente uma cinética de fixação e de depuração de primeira ordem. Caso uma substância ensaiada não siga aproximadamente uma cinética de fixação e de depuração de primeira ordem, há que recorrer a modelos mais complexos (ver referências no apêndice 5) e procurar aconselhamento de um perito em bioestatística ou farmacocinética.

⁽¹⁾ No que se refere à maior parte das substâncias em estudo, não se deve, idealmente, efetuar determinações na água de controlo. As concentrações de fundo só devem ser relevantes no caso dos materiais presentes na natureza (por exemplo, alguns metais) e as substâncias muito disseminadas no ambiente.

⁽²⁾ Uma vez que o BMF é definido como o rácio entre a concentração de uma substância num organismo e a que se encontra presente nos alimentos do organismo no estado estacionário, os lípidos são tidos em conta através da correção do teor de lípidos no organismo e nos alimentos, pelo que é mais corretamente descrito como uma «correção». Esta metodologia difere da «normalização» para um teor de lípidos definido no organismo, como se verifica no ensaio de bioconcentração de exposição aquosa.

Em regra, o BMF é determinado através da análise da substância em estudo no peixe inteiro, em relação à massa húmida. Se pertinente para os objetivos do estudo, é possível recolher tecidos específicos (por exemplo, músculo, fígado) para amostra, se o peixe se dividir em partes comestíveis e não comestíveis (*cf.* ponto 21). Além disso, pode proceder-se à remoção e análise separada do aparelho digestivo para determinar o contributo para as concentrações do peixe inteiro no que se refere aos pontos de amostragem no final da fase de fixação e perto do início da fase de depuração, ou no contexto de uma metodologia de balanço de massas.

Deve determinar-se o teor de lípidos dos peixes inteiros recolhidos para amostra, corrigindo as concentrações em função dos lípidos, tendo em conta o teor de lípidos tanto da dieta como dos peixes (*cf.* pontos 56 e 57 e apêndice 7).

Os peixes recolhidos para amostra devem ser pesados, devendo o seu peso ser registado e relacionado com a concentração de produto químico determinada em cada peixe (p. ex., através de um código de identificação único para cada peixe recolhido para amostra), para efeitos de cálculo do crescimento que pode ocorrer durante o ensaio. Sempre que possível, deve-se igualmente medir o comprimento total dos peixes ⁽¹⁾. Os dados relativos ao peso são também necessários para estimar o BCF através dos dados de depuração do ensaio por via alimentar.

INFORMAÇÕES RELATIVAS À SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

Deve dispor-se de informações sobre a substância em estudo, tal como descrito nos pontos 3 e 22. Em regra, não é necessário utilizar um método analítico para determinar as concentrações da substância em estudo na água; são, contudo, necessários métodos com sensibilidade adequada para determinar as concentrações nos alimentos dos peixes e nos tecidos destes.

É possível ensaiar mais do que uma substância num único ensaio. Todavia, as substâncias em estudo devem ser compatíveis entre si, para que não interajam nem alterem a sua identidade química quando forem introduzidas na alimentação dos peixes. O objetivo consiste em que os resultados determinados para cada substância ensaiada em conjunto não sejam muito diferentes dos resultados que se obteriam em caso de realização de ensaios individuais a cada substância. Devem realizar-se análises preliminares para determinar a possibilidade de recuperar cada substância a partir de alimentos enriquecidos com várias substâncias, bem como de amostras de tecidos dos peixes com i) recuperações elevadas (por exemplo, > 85 % do valor nominal) e ii) a sensibilidade necessária para o ensaio. A dose total de substâncias ensaiadas em conjunto deve ser inferior à concentração combinada passível de provocar efeitos tóxicos (*cf.* ponto 51). Além disso, a conceção experimental deve ter em conta possíveis efeitos adversos nos peixes, bem como o potencial de efeitos interativos (por exemplo, efeitos metabólicos) associados ao ensaio simultâneo de várias substâncias. Deve evitar-se o ensaio simultâneo de substâncias ionizáveis. Em termos de exposição, o método também é adequado para misturas complexas (*cf.* ponto 13, embora se registem as mesmas limitações na análise do que em qualquer outro método).

VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio será considerado válido se se verificarem as seguintes condições (*cf.* ponto 24):

- A variação da temperatura da água deve ser inferior a ± 2 °C nos grupos de tratamento ou de controlo;
- A concentração de oxigénio dissolvido não deve ser inferior a 60 % do valor da concentração de saturação com ar;
- A concentração da substância em estudo na alimentação dos peixes antes da fase de fixação e no final da mesma não deve exceder o intervalo de ± 20 % (com base em pelo menos três amostras em ambos os momentos);
- Deve demonstrar-se um elevado grau de homogeneidade da substância no alimento nas análises preliminares efetuadas à dieta enriquecida; pelo menos três amostras da concentração da substância recolhidas no início do ensaio não devem variar mais do que ± 15 % relativamente à média;

⁽¹⁾ Deve registar-se igualmente o comprimento total durante o ensaio, uma vez que é um bom indicador da ocorrência de um efeito adverso.

- Nos alimentos não enriquecidos ou nos tecidos dos peixes do lote de controlo, não se devem detetar concentrações da substância em estudo, ou estas devem encontrar-se presentes apenas em níveis vestigiais normais, em relação às amostras tratadas;
- A mortalidade ou quaisquer outros efeitos nocivos registados no final do ensaio, tanto no que respeita ao grupo de controlo como ao grupo de ensaio, deve ser $\leq 10\%$; se o ensaio for prolongado por algum motivo, os efeitos adversos em ambos os grupos devem ser $\leq 5\%$ por mês e $\leq 30\%$ cumulativamente. Diferenças significativas no crescimento médio entre os lotes de controlo e de ensaio dos peixes recolhidos para amostra podem indicar um efeito tóxico da substância em estudo.

SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Caso um laboratório nunca tenha realizado o ensaio ou se tenham registado alterações significativas (por exemplo, alteração do fornecedor ou da estirpe dos peixes, espécie diferente, alteração significativa da dimensão dos peixes ou do método de enriquecimento, etc.), recomenda-se a realização de um estudo de competência técnica com uma substância de referência. Esta é utilizada, sobretudo, para determinar se a técnica de enriquecimento dos alimentos é adequada para garantir a homogeneidade e biodisponibilidade máximas das substâncias em estudo. O hexaclorobenzeno (HCB) constitui um exemplo de substância hidrófoba não polar já utilizada, mas, atendendo às suas propriedades perigosas, deve ponderar-se o recurso a outras substâncias para as quais existam dados de fixação e bioamplificação fiáveis⁽¹⁾. Se for utilizada uma substância de referência, o relatório de ensaio deve conter informações básicas sobre a mesma, nomeadamente o nome, o grau de pureza, o número CAS, a estrutura, dados de toxicidade (caso se disponha deles), bem como sobre as substâncias em estudo (cf. pontos 3 e 22).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Equipamento

Os materiais e equipamentos devem ser utilizados do modo descrito no método de exposição aquosa (cf. ponto 26). Deve utilizar-se um sistema de ensaio de renovação dinâmica ou estática que proporcione um volume suficiente de água de diluição aos tanques de ensaio. Os caudais devem ser registados.

Água

A água de ensaio deve ser utilizada do modo descrito no método de exposição aquosa (cf. pontos 27-29). O meio de ensaio deve ser caracterizado como descrito e a respetiva qualidade deve permanecer constante durante o ensaio. No início do ensaio, o teor de partículas naturais e o carbono orgânico total devem ser tão baixos quanto possível (≤ 5 mg/l partículas; ≤ 2 mg/l carbono orgânico total). Só é necessário determinar o COT antes do ensaio no contexto da caracterização da água (cf. ponto 53).

Regime alimentar

Recomenda-se alimento para peixes disponível no mercado (dieta granulada flutuante e/ou que afunde lentamente), caracterizado, pelo menos, pelo teor de proteínas e gordura. Os alimentos devem ser constituídos por granulados de tamanho uniforme para aumentar a eficiência da exposição aos mesmos, *ou seja*, os peixes comerão mais alimentos em vez de ingerirem os pedaços maiores e não os pequenos. Os granulados devem ter uma dimensão adequada ao tamanho dos peixes no início do ensaio (o diâmetro de cada grânulo pode ser sensivelmente 0,6-0,85 mm, para peixes com um comprimento total entre 3 e 7 cm, e 0,85-1,2 mm, para peixes com um comprimento total entre 6 e 12 cm). É possível ajustar a dimensão dos granulados em função do crescimento dos peixes no início da fase de depuração. O anexo 7 apresenta um exemplo de uma composição alimentar adequada disponível no mercado. Nos ensaios para o desenvolvimento do método, foram geralmente utilizados regimes alimentares com um teor de lípidos total entre 15 e 20 % (p/p). Em algumas regiões, podem não se encontrar disponíveis alimentos para peixes com uma concentração de lípidos tão elevada. Nesse caso, os estudos podem utilizar alimentos com uma concentração de lípidos inferior, podendo, se necessário, ajustar-se a taxa de alimentação em conformidade para manter a saúde dos peixes, com base em ensaios preliminares. O teor de lípidos total das dietas do grupo de ensaio e do grupo de controlo deve ser determinado e registado antes do início do ensaio e no final da fase de fixação. O relatório deve conter as informações facultadas pelo fornecedor do alimento comercial no respeitante ao teor de nutrientes, humidade, fibra e cinzas, e, se possível, minerais e resíduos de pesticidas (p. ex., poluentes prioritários «normais»).

⁽¹⁾ O HCB consta dos anexos A e C da Convenção de Estocolmo e dos anexos I e III do Regulamento (CE) n.º 850/2004 relativo a poluentes orgânicos persistentes (JO L 158 de 30.4.2004, p. 7)

Aquando do enriquecimento dos alimentos com a substância em estudo, devem envidar-se todos os esforços para garantir a homogeneidade em toda alimentação de ensaio. A concentração da substância em estudo nos alimentos do grupo de ensaio deve ser selecionada tendo em conta a sensibilidade da técnica analítica, a toxicidade da substância em estudo (NOEC, se conhecida) e os dados físico-químicos relevantes. Se utilizada, a substância de referência deve, preferentemente, ser incorporada numa concentração próxima de 10 % da concentração da substância em estudo — ou, em qualquer caso, o mínimo possível —, sob reserva de uma análise de sensibilidade (p. ex., para o hexaclorobenzeno, considera-se aceitável uma concentração de 1-100 µg/g nos alimentos; ver a referência 47 para informações adicionais sobre as eficiências de assimilação do HCB).

Os alimentos dos peixes podem ser enriquecidos com a substância em estudo de várias formas, consoante as características físicas e a solubilidade da mesma (ver apêndice 7 para informações adicionais sobre os métodos de enriquecimento):

- Se a substância for solúvel e estável em triglicéridos, deve ser dissolvida numa pequena quantidade de óleo de peixe ou óleo vegetal comestível antes de ser misturada com o alimento dos peixes. Neste caso, há que evitar produzir uma ração com um teor de lípidos demasiado elevado, tendo em conta o teor de lípidos natural da alimentação enriquecida, adicionando a quantidade mínima conhecida de óleo necessária para atingir a distribuição e homogeneidade da substância em estudo nos alimentos, ou;
- A alimentação deve ser enriquecida recorrendo a um solvente orgânico adequado, desde que isso não comprometa a homogeneidade e a biodisponibilidade (pode ocorrer a formação de (micro)cristais da substância em estudo nos alimentos em consequência da evaporação do solvente e não existe uma forma fácil de provar que tal não se verificou; cf. (49)), ou;
- Os líquidos não viscosos devem ser adicionados diretamente aos alimentos dos peixes, mas devem ser bem misturados para promover a homogeneidade e facilitar uma boa assimilação. A técnica de mistura deve garantir a homogeneidade do alimento enriquecido.

Num número reduzido de casos — p. ex., substâncias em estudo menos hidrófobas e mais suscetíveis de dessorção dos alimentos —, pode ser necessário revestir os granulados alimentares preparados com uma pequena quantidade de óleo de peixe/milho (ver ponto 142). Nestes casos, os alimentos de controlo devem ser tratados de forma semelhante e deve utilizar-se a alimentação final preparada para determinar o teor de lípidos.

Se for utilizada uma substância de referência, os resultados relativos a esta devem ser comparáveis aos dados de estudos disponíveis na literatura levados a cabo em condições semelhantes com uma taxa de alimentação comparável (cf. ponto 45) e os parâmetros específicos da substância de referência devem cumprir os critérios relevantes constantes do ponto 113 (3.º, 4.º e 5.º travessões).

Caso se utilize um óleo ou um solvente como excipiente para a substância em estudo, deve misturar-se uma quantidade equivalente do mesmo (excluindo a substância em estudo) com o regime alimentar de controlo, de modo a manter a equivalência com a alimentação enriquecida. É importante que, tanto na fase de fixação como na de depuração, sejam fornecidas aos grupos de ensaio e de controlo dietas equivalentes em termos nutricionais.

A alimentação enriquecida deve ser armazenada em condições que mantenham a estabilidade da substância em estudo na alimentação (p. ex., refrigeração), devendo registar-se essas condições.

Seleção das espécies de peixes

Podem utilizar-se as espécies de peixes especificadas para a exposição aquosa (cf. ponto 32 e apêndice 3). A truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a carpa (*Cyprinus carpio*) e o vairão-de-cabeça-grande (*Pimephales promelas*) foram habitualmente utilizados em estudos de bioacumulação por via alimentar com substâncias orgânicas antes da publicação do presente método. As espécies de ensaio devem ter um comportamento alimentar que resulte no consumo rápido da ração alimentar administrada, para minimizar qualquer fator que influencie a concentração da substância em estudo nos alimentos (p. ex., lixiviação para a água e a possibilidade de exposição aquosa). Devem utilizar-se peixes na gama de tamanho/peso recomendada (cf. apêndice 3). Os peixes não devem ser de uma dimensão demasiado reduzida para não dificultarem as análises numa base individual. As espécies ensaiadas numa fase da vida com crescimento rápido podem complicar a interpretação dos dados; as taxas de crescimento elevadas podem influenciar o cálculo da eficiência de assimilação ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Em caso de rápido crescimento durante a fase de fixação, a taxa de alimentação real diminuirá para valores inferiores aos determinados no início da exposição.

Confinamento dos peixes

Os critérios de aceitação relativos à aclimação, à mortalidade e à doença são idênticos aos aplicáveis ao método de exposição aquosa antes da realização do ensaio (cf. pontos 33-35).

REALIZAÇÃO DO ENSAIO

Trabalhos anteriores ao estudo e ensaio de determinação da gama de concentrações

O trabalho analítico prévio ao estudo é necessário para demonstrar a recuperação da substância dos tecidos dos peixes/alimentos enriquecidos. Nem sempre é necessário efetuar um ensaio de determinação da gama de concentrações para selecionar uma concentração adequada nos alimentos. Para efeitos de demonstração da não ocorrência de efeitos adversos e de avaliação da palatabilidade da alimentação enriquecida, da sensibilidade do método analítico aplicado aos tecidos dos peixes e aos alimentos e da seleção da taxa de alimentação adequada e dos intervalos de amostragem durante a fase de depuração, etc., podem realizar-se experiências preliminares facultativas com a alimentação. Um estudo preliminar pode ser útil para estimar o número de peixes necessário para efeitos de amostragem durante a fase de depuração. Esse estudo pode resultar na redução significativa do número de peixes utilizado, especialmente no que se refere a substâncias em estudo especialmente suscetíveis ao metabolismo.

Condições de exposição

Duração da fase de fixação

Em regra, é suficiente uma fase de fixação de 7 a 14 dias, durante a qual um grupo de peixes é alimentado com a dieta de controlo e outro grupo alimentado, diariamente, com uma ração fixa da dieta de ensaio, que varia em função da espécie ensaiada e das condições experimentais, por exemplo, entre 1 e 2 % do peso corporal (massa húmida) no caso da truta-arco-íris. A taxa de alimentação deve ser selecionada de modo a evitar o crescimento rápido e um grande aumento do teor de lípidos. Se necessário, a fase de fixação pode ser prolongada com base na experiência prática de estudos anteriores ou no conhecimento da fixação/depuração da substância em estudo (ou de uma substância análoga) nos peixes. O início do ensaio é definido como o momento da primeira administração de alimentos enriquecidos. Um dia experimental tem início com a alimentação e termina pouco antes (p. ex., uma hora) da alimentação seguinte. Por conseguinte, o primeiro dia experimental de fixação tem início com a primeira administração de alimentos enriquecidos e termina pouco antes da segunda administração dos mesmos. Na prática, a fase de fixação termina pouco antes (por exemplo, uma hora) da primeira alimentação sem a adição da substância em estudo, uma vez que os peixes continuarão a digerir alimentos enriquecidos e a absorver a substância em estudo nas 24 horas seguintes. No que se refere ao método analítico, é importante garantir que se atinge uma carga corporal (não tóxica) suficientemente elevada da substância em estudo, de modo a que seja possível, pelo menos, determinar uma redução da ordem de grandeza durante a fase de depuração. Em casos especiais, pode utilizar-se uma fase de fixação prolongada (até 28 dias) com recolha de amostras adicionais de modo a obter informações sobre a cinética de fixação. Durante a fixação, a concentração nos peixes pode não atingir o estado estacionário. Neste caso, como no ensaio de exposição por via aquosa, podem ser aplicadas equações para estimar o surgimento do estado estacionário, indicador da provável duração necessária para atingir concentrações significativas nos peixes (cf. apêndice 5).

Em alguns casos, pode saber-se que a fixação da substância nos peixes durante 7-14 dias será insuficiente para que a concentração utilizada nos alimentos seja suficientemente elevada para permitir analisar nos peixes, pelo menos, uma redução da ordem de grandeza durante a depuração — quer devido a uma fraca sensibilidade analítica quer a uma eficiência de assimilação reduzida. Nesses casos, pode ser vantajoso prolongar a fase de alimentação inicial para além dos 14 dias; se se tratar, nomeadamente, de substâncias muito metabolizáveis, deve ponderar-se o recurso a uma concentração alimentar mais elevada. Todavia, durante a fixação, há que manter a carga corporal inferior à concentração prevista sem efeitos crónicos observáveis (NOEC) nos tecidos dos peixes (cf. ponto 138).

Duração da fase de depuração

Em regra, a depuração dura, no máximo, 28 dias, tendo início quando os peixes do grupo de ensaio são alimentados com uma dieta pura e não tratada, após a fase de fixação. A depuração tem início com a primeira alimentação «não enriquecida» e não imediatamente após a última alimentação «enriquecida» uma vez que os peixes continuarão a digerir os alimentos e a absorver a substância em estudo nas 24 horas seguintes, tal como referido no ponto 126. Portanto, a primeira amostra da fase de depuração é recolhida pouco antes da segunda alimentação com a dieta não enriquecida. Este período de depuração destina-se a captar substâncias com uma potencial semivida máxima de 14 dias, coerente com a das substâncias biocumulativas ⁽¹⁾, pelo que um período de 28 dias engloba duas semividas destas substâncias. No caso de substâncias com bioacumulação muito elevada, pode ser vantajoso prolongar a fase de depuração (se houver indicações nesse sentido com base em ensaios preliminares).

Se uma substância for depurada muito lentamente, impossibilitando a determinação exata da semivida na fase de depuração, as informações podem ser, todavia, suficientes, num contexto de avaliação, para indicar um nível elevado de bioacumulação. Pelo contrário, se uma substância for depurada muito rapidamente, impossibilitando a obtenção de uma concentração fiável no instante zero (concentração no final da fixação/início da depuração, $C_{0,d}$) e de k_2 , é possível determinar uma estimativa prudente de k_2 (cf. apêndice 7).

Caso as análises dos peixes em intervalos anteriores (por exemplo, 7 ou 14 dias) demonstrem que a substância se depurou até níveis inferiores aos níveis de quantificação antes do final do período de 28 dias, pode não se proceder à recolha subsequente de amostras e concluir-se o ensaio.

Em alguns casos, é possível que não se verifique uma fixação quantificável da substância em estudo no final do período de fixação, nem com a segunda amostra de depuração. Se for possível demonstrar que: i) são cumpridos os critérios de validade constantes do ponto 113; e ii) a ausência de fixação não se deve a outra deficiência do ensaio (por exemplo, duração insuficiente da fase de fixação, deficiência na técnica de enriquecimento da alimentação conducente a uma fraca biodisponibilidade, falta de sensibilidade do método analítico, não-consumo dos alimentos pelos peixes, etc.), pode ser possível concluir o estudo sem a necessidade de o realizar novamente com uma fase de fixação mais longa. Se o trabalho preliminar tiver indicado que tal pode ser o caso, recomenda-se a análise das fezes, se possível, para determinar a ocorrência da substância em estudo não digerida, como parte de uma metodologia de balanço de massas.

Número de peixes

Tal como no ensaio de exposição por via aquosa, devem seleccionar-se peixes de peso e comprimento semelhantes, sendo que os peixes mais pequenos não devem apresentar um peso inferior a dois terços do peso do peixe maior (cf. pontos 40-42).

O número total de peixes para o ensaio deve ser seleccionado com base no calendário de amostragem (um mínimo de uma amostra no final da fase de fixação e quatro a seis amostras durante a fase de depuração, mas dependendo das durações das fases), tomando em conta a sensibilidade da técnica analítica, a concentração suscetível de ser alcançada no final da fase de fixação (com base em conhecimentos prévios) e a duração da depuração (caso seja possível fazer uma estimativa com base em conhecimentos prévios). Devem recolher-se cinco a dez peixes em cada amostragem, medindo-se os parâmetros de crescimento (peso e comprimento total) antes da análise do produto químico ou dos lípidos.

Devido à variabilidade do tamanho, da velocidade de crescimento e da fisiologia entre os peixes, bem como à provável variação da quantidade de dieta administrada que cada peixe consome, devem ser recolhidos para amostra, em cada intervalo, pelo menos cinco peixes do grupo de ensaio e cinco do grupo de controlo, com vista a estabelecer de modo adequado a concentração média e a respetiva variabilidade. Atendendo às metodologias analíticas utilizadas, a variabilidade entre os peixes é suscetível de contribuir mais para a variabilidade não controlada total no ensaio do que a variabilidade inerente, o que, em alguns casos, justifica a utilização de um número máximo de dez peixes por ponto de amostragem. Todavia, se as concentrações de fundo da substância em estudo nos peixes do lote de controlo não forem quantificáveis no início da depuração, pode ser suficiente a análise química de dois a três peixes deste lote apenas no intervalo de amostragem final, desde que os restantes peixes do lote de controlo sejam recolhidos em todos os pontos de amostragem para determinação do peso e do comprimento total (colheita do mesmo número de amostras nos grupos de ensaio e de controlo, para efeitos de determinação do crescimento). Os peixes devem ser armazenados e pesados individualmente — mesmo que se verifique a necessidade de combinar subsequentemente os resultados das amostras —, devendo também medir-se o comprimento total.

⁽¹⁾ Num estudo de exposição aquosa, uma semivida de 14 dias corresponderia a um BCF de cerca de 10 000 l/kg utilizando peixes de 1 g com uma respetiva velocidade de fixação de cerca de 500 L/kg/d (segundo a equação de Sijm *et al* (46)).

Um ensaio normal com cinco amostras cuja fase de depuração dure, por exemplo, 28 dias, implica a utilização de um total de 59-120 peixes do grupo de ensaio e 50-110 do grupo de controlo, partindo do princípio de que a técnica analítica da substância permite efetuar a análise do teor de lípidos nos peixes em causa. Se não for possível realizar a análise aos lípidos nos mesmos peixes que foram objeto da análise do produto químico nem utilizar os peixes do lote de controlo apenas para a análise aos lípidos (cf. ponto 56), são necessários 15 peixes adicionais (três da população de reserva no início do ensaio, três dos grupos de controlo e de ensaio no início da depuração e três dos grupos de controlo e de ensaio no final da experiência). O apêndice 4 apresenta um exemplo de calendário de amostragem em função do número de peixes.

Carga

Devem utilizar-se rácios água/peixes elevados, semelhantes aos utilizados no método de exposição aquosa (cf. pontos 43 e 44). Embora as taxas de carga peixes/água não afetem as concentrações de exposição neste ensaio, recomenda-se uma taxa de carga de 0,1-1,0 g de peixes (massa húmida) por litro de água, por dia, para manter concentrações de oxigénio dissolvido adequadas e minimizar a tensão do organismo de ensaio.

Alimentação e dieta de ensaio

Durante o período de aclimação, os peixes devem ser alimentados com uma dieta adequada, como descrito supra (ponto 117). Se o ensaio for realizado em condições dinâmicas, estas devem ser suspensas durante a alimentação dos peixes.

Durante o ensaio, a dieta do grupo de ensaio deve ser conforme com a descrita supra (pontos 116-121). Para além da ponderação de fatores específicos da substância, da sensibilidade analítica, da concentração prevista da dieta em condições ambientais e da carga corporal/níveis de toxicidade crónica, a seleção da concentração da substância a incluir na dieta deve ter em conta a palatabilidade do alimento, para que os peixes não evitem a sua ingestão. A concentração nominal da substância em estudo nos alimentos deve ser registada no relatório. Com base na experiência, as concentrações de enriquecimento entre 1-1 000 µg/g proporcionam um intervalo prático de trabalho para as substâncias em estudo que não apresentam um mecanismo tóxico específico. No que se refere às substâncias que atuam através de um mecanismo não específico, os níveis de resíduos nos tecidos não devem exceder 5 µmol/g de lípidos, uma vez que um teor superior a este é suscetível de implicar efeitos crónicos (19) (48) (50) (1). Relativamente a outras substâncias, deverá zelar-se por que não ocorram efeitos adversos decorrentes da exposição acumulada (cf. ponto 127). O que precede é especialmente importante caso se ensaiem várias substâncias em simultâneo (cf. ponto 112).

O alimento dos peixes pode ser enriquecido com a quantidade adequada de substância em estudo por uma de três formas, como descrito no ponto 119 e no apêndice 7. Os métodos e procedimentos de enriquecimento da alimentação devem ser documentados no relatório. Os peixes do lote de controlo são alimentados com um alimento não tratado que contenha uma quantidade equivalente de óleo/excipientes não enriquecido — caso este tenha sido utilizado na alimentação enriquecida durante a fase de fixação — ou tratado com solvente puro, caso se tenha utilizado um solvente como excipiente na preparação da dieta do grupo de ensaio. Ambas as dietas, com e sem tratamento, devem ser analisadas, pelo menos, em triplicado, para determinar a concentração da substância em estudo antes do início e no final da fase de fixação. Após a exposição aos alimentos tratados (fase de fixação), os peixes de ambos os grupos são alimentados com alimento não tratado (fase de depuração).

Os peixes são alimentados com uma ração fixa, de acordo com a espécie (p. ex., cerca de 1-2 % da massa corporal húmida, por dia no caso da truta-arco-íris). A taxa de alimentação deve ser selecionada de modo a evitar o crescimento rápido e um grande aumento do teor de lípidos. Deve registar-se a taxa de alimentação exata definida para a experiência. A alimentação inicial deve basear-se nas pesagens programadas da população de reserva imediatamente antes do início do ensaio. A quantidade de alimentos deve ser ajustada em função da massa húmida dos peixes amostrados em cada colheita, para ter em conta o crescimento durante a experiência. O peso e o comprimento dos peixes nos tanques de ensaio e de controlo podem ser estimados a partir do peso e do comprimento total dos peixes recolhidos em cada amostragem; não se devem pesar nem medir os peixes que permanecem nos tanques de ensaio e de controlo. É importante manter a mesma taxa de alimentação durante toda a experiência.

(1) Uma vez que as concentrações internas reais só podem ser determinadas depois da realização do ensaio, é necessário efetuar uma estimativa das concentrações internas previstas (p. ex., com base no BMF previsto e na concentração no alimento; cf. equação A5.8 no apêndice 5).

Deve vigiar-se a alimentação para assegurar que os peixes consomem claramente todo o alimento oferecido, de forma a garantir a utilização de taxas de ingestão adequadas nos cálculos. A seleção de uma taxa de alimentação que garanta o consumo total dos alimentos fornecidos diariamente deve ter em conta eventuais experiências preliminares de alimentação ou a experiência adquirida. Caso se verifique que permanecem sistematicamente alimentos por ingerir, pode ser recomendável fornecer uma parte da dose num período de alimentação adicional em cada dia (por exemplo, substituir a alimentação fornecida uma vez por dia por metade da mesma quantidade duas vezes por dia). Caso seja necessária, a segunda alimentação deve ocorrer a uma determinada hora e ser cronometrada para que decorra o período máximo possível antes da recolha dos peixes para amostra (p. ex., definindo o momento da segunda alimentação na primeira metade do dia experimental).

Embora, em geral, os peixes consumam os alimentos rapidamente, é importante garantir que a substância em estudo permanece adsorvida nos mesmos. Devem envidar-se esforços para evitar que a substância se disperse na água a partir dos alimentos, expondo assim os peixes a concentrações aquosas da substância em estudo para além da via alimentar. Isso é possível mediante a remoção de todo o alimento não ingerido (e das fezes) dos tanques de ensaio e de controlo na hora subsequente à alimentação — de preferência, nos 30 minutos seguintes. Além disso, pode utilizar-se um sistema no qual a água é constantemente limpa por recurso a um filtro de carvão ativado, para absorver qualquer contaminante dissolvido. Os sistemas dinâmicos podem ajudar a escoar rapidamente as partículas de alimentos e as substâncias dissolvidas ⁽¹⁾. Em alguns casos, o recurso a uma técnica de preparação dos alimentos enriquecidos ligeiramente alterada pode contribuir para atenuar este problema (ver ponto 119).

Luz e temperatura

Tal como no método de exposição por via aquosa (cf. ponto 48), recomenda-se um fotoperíodo de 12 a 16 horas e uma temperatura (± 2 °C) adequada à espécie de ensaio utilizada (cf. apêndice 3). O tipo e as características da iluminação devem ser conhecidos e documentados.

Controlos

Deve utilizar-se um grupo de controlo constituído por peixes alimentados com a mesma ração que no caso do grupo de ensaio, mas sem a substância em estudo. Caso se utilize um óleo ou solvente como excipiente para enriquecer a alimentação no grupo de ensaio, o alimento do grupo de controlo deve ser tratado exatamente da mesma forma, mas sem a substância em estudo, para que as dietas do grupo de ensaio e do grupo de controlo sejam equivalentes (cf. pontos 121 e 139).

Frequência das determinações da qualidade da água

As condições descritas no método de exposição aquosa também são aplicáveis neste caso, exceto o facto de apenas ser necessário determinar o COT antes do ensaio como parte da caracterização da água de ensaio (cf. ponto 53).

Amostragem e análise dos peixes e da dieta

Análise de amostras da dieta

As amostras das dietas de ensaio e de controlo devem ser analisadas, pelo menos, em triplicado, para determinar a presença da substância em estudo e o teor de lípidos, pelo menos, antes do início e no final da fase de fixação. Os métodos de análise e os procedimentos para garantir a homogeneidade da dieta devem ser registados no relatório.

⁽¹⁾ A presença da substância em estudo no meio de ensaio em consequência das excreções dos peixes ou da lixiviação dos alimentos pode não ser completamente evitável. Como alternativa, pode determinar-se a concentração da substância na água no final do período de fixação, especialmente se se utilizar uma instalação semiestática, para ajudar a determinar se ocorreu exposição aquosa.

As amostras devem ser analisadas pelo método estabelecido e validado para determinar a presença da substância em estudo. Deve efetuar-se um trabalho prévio ao estudo para determinar o limite de quantificação, a percentagem de recuperação, as eventuais interferências e a variabilidade analítica na matriz da amostra pretendida. Caso se utilize uma substância com marcação radioativa, devem ser tidos em conta os mesmos aspetos que no método de exposição aquosa, sendo que a análise da alimentação substitui a análise da água (*cf.* ponto 65).

Análise dos peixes

Em cada amostragem, são recolhidos entre 5 e 10 peixes dos tratamentos de exposição e de controlo (em alguns casos, o número de peixes do lote de controlo pode ser reduzido; *cf.* ponto 134).

Em cada dia experimental, as colheitas de amostras devem ser efetuadas no mesmo momento em relação à hora da alimentação e ser cronometradas de modo a minimizar a probabilidade da permanência de alimento nos intestinos durante a fase de fixação e a parte inicial da fase de depuração, com vista a evitar contributos falsos para as concentrações totais da substância em estudo (os peixes que constituem as amostras devem ser removidos no final de cada dia experimental, não esquecendo que este tem início no momento da alimentação e termina no momento da alimentação seguinte, cerca de 24 horas depois. A depuração tem início com a primeira alimentação não enriquecida; *cf.* ponto 128). A primeira amostra da fase de depuração — recolhida pouco antes da segunda alimentação não enriquecida — é importante porque a extrapolação para o dia anterior a esta medição é utilizada para estimar a concentração no instante zero ($C_{0,d}$, a concentração nos peixes no final da fixação/início da depuração). Facultativamente, o aparelho digestivo dos peixes pode ser removido e analisado em separado no final da fase de fixação e nos dias 1 e 3 da depuração.

Em cada colheita de amostra, devem remover-se peixes de ambos os recipientes de ensaio, sendo os peixes tratados de forma idêntica à descrita no método aquoso (*cf.* pontos 61-63).

As concentrações da substância em estudo nos peixes inteiros (massa húmida) são determinadas, pelo menos, no final da fase de fixação e durante a fase de depuração, tanto no grupo de controlo como no grupo de ensaio. Durante a fase de depuração, recomendam-se quatro a seis pontos de amostragem (por exemplo, nos dias 1, 3, 7, 14 e 28). Facultativamente, pode incluir-se um ponto de amostragem adicional após 1-3 dias de fixação, para estimar a eficiência de assimilação da fase linear de fixação, enquanto os peixes ainda se encontram quase no início do período de exposição. São possíveis dois desvios ao calendário: i) se se utilizar uma fase de fixação prolongada para efeitos de investigação da cinética de fixação, haverá pontos de amostragem adicionais durante a fase de fixação, pelo que será necessário utilizar um número mais elevado de peixes (*cf.* ponto 126); ii) se o estudo tiver sido concluído no final da fase de fixação devido à ausência de fixação quantificável (*cf.* ponto 131). Cada peixe recolhido para amostra deve ser pesado e o respetivo comprimento total medido, para permitir a determinação das constantes de velocidade de crescimento. Também é possível determinar as concentrações da substância em tecidos específicos dos peixes (porções comestíveis e não comestíveis) no final da fixação e em pontos selecionados no decurso da depuração. Caso se ensaie uma substância com marcação radioativa, devem ser tidos em os mesmos aspetos que no método de exposição aquosa, sendo que a análise da alimentação substitui a análise da água (*cf.* ponto 65).

No que diz respeito à utilização periódica de uma substância de referência (*cf.* ponto 25), é preferível que, no grupo de ensaio, as concentrações sejam determinadas no final da fixação e em todos os pontos do processo de depuração especificados para a substância em estudo (peixe inteiro); só é necessário analisar as concentrações no grupo de controlo no final da fixação (peixe inteiro). Em determinadas circunstâncias — p. ex., se as técnicas de análise para a substância em estudo e para a substância de referência forem incompatíveis, sendo necessária a utilização de peixes adicionais para cumprir o calendário de amostragem —, é possível utilizar outra metodologia, do modo que se segue, para minimizar o número de peixes adicionais necessários. As concentrações da substância de referência são determinadas durante a depuração apenas nos dias 1, 3 e em dois pontos de amostragem adicionais, selecionados de modo a que seja possível estabelecer estimativas fiáveis da concentração do instante zero ($C_{0,d}$) e de k_2 para a substância de referência.

Se possível, o teor de lípidos de cada peixe deve ser determinado em cada ponto de amostragem ou, pelo menos, no início e no final da fase de fixação e no final da fase de depuração. (*cf.* pontos 56 e 67). Consoante o método analítico (consultar ponto 67 e apêndice 4), pode ser possível utilizar os mesmos peixes para determinar tanto o teor de lípidos como a concentração da substância em estudo, o que é preferível para minimizar o número de peixes. Todavia, caso tal não seja possível, pode utilizar-se a metodologia descrita no método de exposição aquosa (ver ponto 56 para estas opções alternativas de determinação do teor de lípidos). O método utilizado para quantificar o teor de lípidos deve ser documentado no relatório.

Qualidade do método analítico

Devem realizar-se verificações experimentais para garantir a especificidade, exatidão, precisão e reprodutibilidade da técnica analítica específica da substância, bem como proceder a recuperações da substância em estudo, tanto a partir do alimento como dos peixes.

Determinação do crescimento dos peixes

No início do ensaio, é necessário pesar uma amostra de peixes da população de reserva e medir o comprimento total dos mesmos. Estes peixes devem ser recolhidos para amostra pouco antes (p. ex., uma hora) da primeira alimentação enriquecida e atribuídos ao dia experimental 0. O número de peixes para esta amostra deve ser, pelo menos, igual ao utilizado nas amostras de ensaio. Alguns deles podem ser os mesmos peixes utilizados para a análise do teor de lípidos antes do início da fase de fixação (cf. ponto 153). Em cada intervalo de amostragem, os peixes são, antes de mais, pesados e o respetivo comprimento total medido. Em cada peixe individual, o peso determinado — e o comprimento — devem ser relacionados com a concentração obtida na análise do produto químico (e com o teor de lípidos, se pertinente), por exemplo, através de um código de identificação único para cada peixe recolhido. As medições destes peixes recolhidos para amostra podem ser utilizadas para estimar o peso e o comprimento dos peixes que permanecem nos tanques de ensaio e de controlo.

Avaliação experimental

As observações da mortalidade devem ser efetuadas e registadas diariamente. Devem realizar-se observações adicionais para a pesquisa de efeitos adversos — por exemplo, para verificar a ocorrência de comportamento ou pigmentação anormais —, que devem ser registadas. Considera-se que os peixes estão mortos se não se verificar movimento respiratório nem se detetar qualquer reação a um ligeiro estímulo mecânico. Todos os peixes mortos ou claramente moribundos devem ser removidos.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

Os resultados dos ensaios são utilizados para obter a constante de velocidade de depuração (k_2) em função da massa húmida total dos peixes. A constante de velocidade de crescimento, k_g , com base no aumento médio do peso dos peixes, é calculada e utilizada para obter a constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento, k_{2g} , se adequado. Além disso, deve registar-se a eficiência de assimilação a (absorção a partir do intestino), o fator de bioamplificação cinético (BMF_K) — se necessário, corrigido em função do crescimento, BMF_{K_g} —, o respetivo valor corrigido em função dos lípidos (BMF_{K_L} ou $BMF_{K_{g_L}}$, se corrigido em função da diluição de crescimento) e a taxa de alimentação. Além disso, se for possível efetuar uma estimativa do surgimento do estado estacionário na fase de fixação (por exemplo, 95 % do estado estacionário ou $t_{95} = 3,0/k_2$), pode incluir-se uma estimativa do BMF do estado estacionário (BMF_{SS}) (cf. pontos 105 e 106 e apêndice 5) se o valor t_{95} indicar a possibilidade de terem sido atingidas as condições do estado estacionário. Deve aplicar-se a este BMF_{SS} a mesma correção em função dos lípidos aplicada ao BMF obtido por via cinética (BMF_K) para obter um valor corrigido em função dos lípidos, BMF_{SS_L} (importa salientar que não existe nenhum procedimento normalizado para corrigir um BMF do estado estacionário em função da diluição de crescimento). As fórmulas e os exemplos de cálculos constam do apêndice 7. Encontram-se disponíveis metodologias que tornam possível estimar um fator de bioconcentração cinético (BCF_K) a partir de dados gerados no estudo relativo à via alimentar. Vide o apêndice 8.

Dados sobre o peso/comprimento dos peixes

A massa húmida e o comprimento de cada peixe em todos os períodos são apresentados separadamente, sob a forma de quadro, no respeitante aos grupos de ensaio e de controlo, para todos os dias de amostragem durante a fase de fixação (população de reserva para o início da fixação; grupo de controlo e grupo de ensaio para o final da fixação e, se realizada, a fase inicial (por exemplo, dia 1-3 da fixação) e a fase de depuração (por exemplo, dias 1, 2, 4, 7, 14, 28, para os grupos de controlo e de ensaio). O peso é a medida de crescimento preferível para efeitos de correção em função da diluição de crescimento. Ver os pontos 162 e 163 e o apêndice 5 no respeitante ao método, ou aos métodos, utilizados para corrigir os dados em função da diluição de crescimento.

Dados relativos à concentração da substância em estudo nos peixes

As medições dos resíduos da substância em estudo em cada peixe (ou em amostras de peixes combinadas, caso não sejam possíveis medições individuais), expressas em concentração relativamente à massa húmida (p/p), são apresentadas, na forma de quadro, para os peixes de controlo e os peixes de ensaio, para cada ponto de amostragem. Caso se tenha determinado o teor de lípidos em cada peixe recolhido para amostra, é possível obter e apresentar na forma de quadro as concentrações individuais corrigidas em função dos lípidos, expressas em concentração ponderal de lípidos.

- As medições dos resíduos da substância em estudo em cada peixe (ou nas amostras combinadas de peixes, caso não sejam possíveis medições individuais — cf. ponto 66), para o período de depuração, são convertidas nos seus logaritmos naturais e representadas graficamente em função do tempo (dia). Se uma inspeção visual da representação gráfica revelar valores anómalos evidentes, é possível aplicar um teste estatisticamente válido aos valores anómalos para eliminar dados espúrios e apresentar uma justificação documentada para a sua omissão.
- Procede-se a uma análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, dos dados relativos ao logaritmo natural da concentração em função dos dados de depuração (dia). O declive e a ordenada na origem são registados como constante de velocidade de depuração global (k_2) e logaritmo natural da concentração obtida no instante zero ($C_{0,d}$) — ver os apêndices 5 e 7 para informações adicionais. Caso tal não seja possível por as concentrações serem inferiores ao limite de quantificação para a segunda amostra da depuração, pode efetuar-se uma estimativa prudente de k_2 (cf. apêndice 7).
- Calculam-se as variâncias do declive e da ordenada na origem por processos estatísticos normais e avaliam-se e apresentam-se os intervalos de confiança a 90 % (ou 95 %) em torno destes resultados.
- A concentração média determinada nos peixes para o último dia de fixação (concentração determinada no instante zero, $C_{0,m}$) é também calculada e comparada com o valor $C_{0,d}$ obtido. Se o valor calculado for inferior ao valor medido, a diferença pode sugerir a presença de alimento enriquecido não digerido nos intestinos. Se o valor calculado for muito superior ao valor medido, tal pode indicar que o valor obtido a partir da regressão linear dos dados relativos à depuração é incorreto e deve ser reavaliado (ver apêndice 7).

Velocidade de depuração e fator de bioamplificação

Para calcular o fator de bioamplificação a partir dos dados, é necessário, antes de mais, obter a eficiência de assimilação (absorção da substância em estudo no intestino, a). Para tal, utiliza-se a equação A7.1 que consta do apêndice 7, sendo necessário conhecer a concentração obtida nos peixes no instante zero da fase de depuração ($C_{0,d}$), a constante de velocidade de depuração (global) (k_2), a concentração no alimento (C_{alimento}), a constante de velocidade de ingestão do alimento (I) e a duração do período de fixação (t). O declive e a ordenada na origem da relação linear entre o logaritmo natural da concentração e o tempo de depuração são registados como constante de velocidade de depuração global ($k_2 = \text{declive}$) e concentração do instante zero ($C_{0,d} = e^{\text{ordenada}}$), como referido supra. Os valores obtidos devem ser verificados para determinar a sua plausibilidade biológica (por exemplo, a eficiência de assimilação como fração não deve ser superior a 1). (I) é calculada mediante a divisão da massa de alimento pela massa de peixes alimentados por dia (se alimentados com 2 % do peso corporal, (I) será 0,02). Contudo, pode ser necessário ajustar a taxa de alimentação utilizada no cálculo em função do crescimento dos peixes (pode recorrer-se à constante de velocidade de crescimento conhecida para estimar o peso dos peixes em cada momento durante a fase de fixação; cf. apêndice 7). Sempre que não seja possível obter k_2 e $C_{0,d}$ porque, por exemplo, as concentrações da segunda amostra de depuração são inferiores ao limite de deteção, pode efetuar-se uma estimativa prudente de k_2 e de um «limite superior» do BMF_k (cf. apêndice 7).

Depois de obtida a eficiência de assimilação (a), é possível calcular o fator de bioamplificação através da multiplicação de a pela constante de velocidade de ingestão (I) e da divisão pela constante de velocidade de depuração (global) (k_2). O fator de bioamplificação corrigido em função do crescimento é calculado da mesma forma, mas com a constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento (k_{2g} ; cf. pontos 162 e 163). É possível obter uma estimativa alternativa da eficiência de assimilação se a análise dos tecidos tiver sido realizada em peixes recolhidos para amostra na fase linear inicial da fase de fixação — ver o ponto 151 e o apêndice 7. Este valor representa uma estimativa independente da eficiência de assimilação para um organismo essencialmente não exposto (ou seja, os peixes encontram-se quase no início da fase de fixação). A eficiência de assimilação estimada a partir dos dados de depuração é normalmente utilizada para obter o BMF.

Correção em função dos lípidos e correção em função da diluição de crescimento

O crescimento dos peixes durante a fase de depuração pode reduzir as concentrações de produto químico determinadas nos peixes, tornando a constante de velocidade de depuração global, k_z , superior ao que se verificaria apenas nos processos de remoção (por exemplo, metabolismo, defecação) (cf. ponto 72). Na prática, o teor de lípidos dos peixes de ensaio — que se encontra fortemente associado à bioacumulação de substâncias hidrófobas — e o teor de lípidos dos alimentos podem variar o suficiente para que seja necessário efetuar uma correção em função dos mesmos, de modo a que os fatores de bioamplificação sejam apresentados de uma forma significativa. O fator de bioamplificação deve ser corrigido em função da diluição de crescimento (tal como o BCF cinético no método de exposição aquosa) e em função do teor de lípidos dos alimentos relativamente ao dos peixes (fator de correção em função dos lípidos). Os apêndices 5 e 7, respetivamente, apresentam equações e exemplos destes cálculos.

Para efetuar uma correção em função da diluição de crescimento, deve calcular-se a constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento (k_{zg}) (ver apêndice 5 para equações). A constante de velocidade de depuração corrigida é posteriormente utilizada para calcular o fator de bioamplificação corrigido em função do crescimento, tal como no ponto 73. Em alguns casos, esta metodologia não é viável. Uma metodologia alternativa, que contorna a necessidade da correção em função da diluição de crescimento, implica a utilização de dados de depuração relativos à massa da substância em estudo por peixe (com base no peixe inteiro), ao invés dos dados (de concentração) relativos à massa normal da substância em estudo por unidade de massa de peixe. Tal pode ser facilmente alcançado, uma vez que os ensaios realizados em conformidade com este método devem relacionar as concentrações registadas nos tecidos com o peso de cada peixe. O procedimento simples para realizar o que precede encontra-se descrito no apêndice 5. Todavia, importa salientar que se deve estimar e registar k_z , mesmo em caso de utilização da metodologia alternativa.

Para efetuar uma correção em função do teor de lípidos dos alimentos e dos peixes nos casos em que não se tenha efetuado uma análise dos lípidos em todos os peixes recolhidos para amostra, são obtidas as frações médias de lípidos (p/p) nos peixes e nos alimentos ⁽¹⁾. Subsequentemente, calcula-se o fator de correção em função dos lípidos (L_c) através da divisão da fração média de lípidos dos peixes pela fração média de lípidos dos alimentos. O fator de bioamplificação, corrigido ou não em função do crescimento, consoante pertinente, é dividido pelo fator de correção em função dos lípidos para calcular o fator de bioamplificação corrigido em função dos lípidos.

Caso as análises da substância em estudo e dos lípidos sejam realizadas nos mesmos peixes em cada ponto de amostragem, é possível utilizar os dados relativos aos tecidos, corrigidos em função do teor de lípidos dos peixes individuais, para calcular diretamente um BMF corrigido em função dos lípidos (cf. (37)). A representação gráfica dos dados de concentração corrigidos em função dos lípidos fornece o valor $C_{0,d}$ relativamente aos lípidos e o valor k_z . A análise matemática pode então utilizar as mesmas equações constantes do apêndice 7, mas a eficiência de assimilação (a) é calculada com a constante de velocidade de ingestão de alimentos normalizada em função dos lípidos ($I_{\text{lípidos}}$) e a concentração alimentar com base nos lípidos ($C_{\text{alimentos-lípidos}}$). Subsequentemente, são utilizados, de forma semelhante, parâmetros corrigidos em função dos lípidos para calcular o BMF (importa salientar que a correção em função da constante de velocidade de crescimento também deve ser aplicada à fração de lípidos e não à massa húmida dos peixes para calcular o BMF_{kgL} corrigido em função dos lípidos e do crescimento).

Interpretação dos resultados

Para excluir efeitos tóxicos, o crescimento médio nos grupos de ensaio e de controlo não deve, em princípio, ser significativamente diferente. As constantes de velocidade de crescimento ou as curvas de crescimento dos dois grupos devem ser comparadas por um procedimento adequado ⁽²⁾.

Relatório de ensaio

Após a conclusão do estudo, elabora-se um relatório final com as informações sobre a *substância em estudo*, a *espécie utilizada no ensaio* e as *condições do ensaio*, tal como enumeradas no ponto 81 (como para o método de exposição aquosa). Além disso, são necessárias as seguintes informações:

- ⁽¹⁾ Esta metodologia é específica do estudo alimentar, diferente do procedimento seguido na exposição aquosa; daí a utilização do vocábulo «correção» em vez de «normalização» para evitar confusões — ver também a nota de rodapé no ponto 106.
- ⁽²⁾ É possível efetuar um teste t às constantes de velocidade de crescimento, de modo a determinar se o crescimento difere entre os grupos de ensaio e de controlo, ou um teste F em caso de análise da variância. Se necessário, é possível utilizar um teste F ou um teste de rácio da verosimilhança para ajudar na seleção do modelo de crescimento adequado (monografia da OCDE, 54, (32)).

Substância em estudo:

- Todas as informações relativas à estabilidade da substância em estudo nos alimentos preparados;

Condições de ensaio:

- Concentração nominal da substância no alimento, técnica de enriquecimento, quantidade de excipiente (de lípidos) utilizada no processo de enriquecimento do alimento (se pertinente), determinações da concentração da substância em estudo na dieta enriquecida para cada análise (pelo menos em triplicado antes do início do estudo e no final da fixação) e valores médios;
- Se for o caso, tipo e qualidade do solvente ou óleo utilizado como excipiente (qualidade, fornecedor, etc.) para o enriquecimento do alimento;
- Tipo de alimento utilizado (análise imediata ⁽¹⁾, qualidade, fornecedor, etc.), taxa de alimentação durante a fase de fixação, quantidade de alimento administrada e frequência da administração (incluindo quaisquer ajustamentos com base no peso dos peixes recolhidos para amostra);
- Hora a que os peixes foram recolhidos e eutanasiados para efeitos de análise química, para cada ponto de amostragem (por exemplo, uma hora antes da alimentação do dia seguinte);

Resultados:

- Resultados de quaisquer trabalhos preliminares do ensaio;
- Informações sobre quaisquer efeitos adversos observados;
- Descrição completa de todos os procedimentos de análise química utilizados, nomeadamente limites de deteção e quantificação, variabilidade e recuperação;
- Concentrações de lípidos determinadas nos alimentos (dieta enriquecida e de controlo) — valores individuais, médias e desvios-padrão;
- Quadros com dados sobre o peso — e comprimento — dos peixes, para cada espécime, tanto no que respeita aos grupos de controlo e como aos grupos de exposição (por exemplo, utilizando identificadores únicos para cada peixe); cálculos, constante(s) de velocidade de crescimento obtida(s) e intervalo(s) de confiança a 95 %;
- Quadros com dados sobre a concentração da substância em estudo nos peixes, a concentração média determinada no final da fixação ($C_{0,m}$) e a constante de velocidade de depuração (global) obtida (k_2), bem como a concentração nos peixes no início da fase de depuração ($C_{0,d}$), juntamente com as variâncias destes valores (declive e ordenada na origem);
- Quadros com dados sobre o teor de lípidos dos peixes (ordenados em função das concentrações específicas da substância, se pertinente), os valores médios respeitantes ao grupo de ensaio e ao grupo de controlo no início do ensaio, no final da fixação e no final da depuração;
- Curvas (incluindo todos os dados determinados) que ilustrem os seguintes parâmetros (se pertinente, as concentrações podem ser expressas em relação ao corpo inteiro do animal ou a determinados tecidos do mesmo):
 - crescimento (ou seja, peso dos peixes — e comprimento — em função do tempo) ou logaritmo natural do peso em função do tempo;
 - depuração da substância em estudo nos peixes; e
 - logaritmo natural da concentração em função do tempo de depuração (incluindo a constante de velocidade de depuração obtida, k_2 , e o logaritmo natural da concentração obtida nos peixes no início da fase de depuração, $C_{0,d}$).
- Se uma inspeção visual de uma representação gráfica revelar valores anómalos evidentes, é possível aplicar um teste estatisticamente válido a estes valores, para eliminar dados espúrios e apresentar uma justificação documentada para a sua omissão.

⁽¹⁾ Técnica de análise dos alimentos no que respeita às proteínas, aos lípidos, à fibra bruta e ao teor de cinzas; em regra, o fornecedor do alimento disponibiliza estas informações.

- O cálculo da constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento e da semivida corrigida em função do crescimento.
- Eficiência de assimilação calculada (α).
- BMF «bruto» por via alimentar, BMF cinético corrigido em função do crescimento e dos lípidos («bruto» e corrigido em função dos lípidos com base na massa húmida do peixe inteiro) e BMF específico dos tecidos, se pertinente.
- Quaisquer informações relativas aos metabolitos da substância em estudo com marcação radioativa e à respetiva acumulação.
- Devem referir-se quaisquer ocorrências especiais registadas no decurso do ensaio, bem como quaisquer desvios relativamente ao procedimento ou outras informações de relevo.
- Um quadro recapitulativo dos dados calculados e medidos pertinentes, como:

Constantes de velocidade de depuração da substância e fatores de bioamplificação (BMF _K)	
k_g (constante de velocidade de crescimento; dia ⁻¹):	Inserir valor (IC 95 %) ⁽¹⁾
k_2 (constante de velocidade de depuração global; dia ⁻¹):	Inserir valor (IC 95 %)
k_{2g} (constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento; dia ⁻¹):	Inserir valor (IC 95 %) ⁽¹⁾
$C_{0,m}$ (concentração determinada no instante zero, a concentração nos peixes no final da fixação) (µg/g):	Inserir valor ± SD ⁽²⁾
$C_{0,d}$ (concentração obtida no instante zero da fase de depuração; µg/g):	Inserir valor ± SD ⁽²⁾
I (taxa de ingestão da alimentação definida; g alimento/g peixes/dia):	Inserir valor
I_g (taxa de alimentação real, ajustada em função do crescimento; g alimento/g peixes/dia) ⁽²⁾ :	Inserir valor ± SD ⁽²⁾
C_{alimento} (concentração da substância química no alimento; µg/g):	Inserir valor ± SD ⁽²⁾
α (eficiência de assimilação da substância):	Inserir valor ± SD ⁽²⁾
BMF _K (BMF cinético por via alimentar):	Inserir valor (IC 95 %) ⁽¹⁾
BMF _{Kg} (BMF cinético por via alimentar corrigido em função do crescimento):	Inserir valor (IC 95 %) ⁽¹⁾
$t_{1/2g}$ (semivida, em dias, corrigida em função do crescimento):	Inserir valor ± SD ⁽²⁾
L_c (fator de correção em função dos lípidos):	Inserir valor
BMF _{Kgl} (BMF cinético corrigido em função do crescimento e dos lípidos):	Inserir valor
BMF _{ss-l} (BMF indicativo do estado estacionário corrigido em função dos lípidos) ⁽²⁾ :	Inserir valor ± SD ⁽²⁾

⁽¹⁾ IC: intervalo de confiança (sempre que a estimativa seja possível)

⁽²⁾ SD: Desvio-padrão (sempre que a estimativa seja possível)

REFERÊNCIAS

- 1) Capítulo C.13 do presente anexo: *Bioconcentração: ensaio dinâmico com peixe.*
- 2) Capítulo A.6 do presente anexo: *Solubilidade em água*
- 3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. *Environ Toxicol Chem* 12: 2031-2035
- 4) Capítulo A.8 do presente anexo: *Coeficiente de partição (n-octanol/água): método do frasco agitado.*
- 5) Capítulo A.24 do presente anexo: *Coeficiente de partição (n-octanol/água), método por HPLC.*
- 6) Capítulo A.23 do presente anexo: *Coeficiente de partição (1-octanol/água): método de agitação lenta.*
- 7) Capítulo C.7 do presente anexo: *Hidrólise em função do pH.*
- 8) OCDE (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- 9) Capítulo A.5 do presente anexo: *Tensão superficial de soluções aquosas.*
- 10) Capítulo A.4 do presente anexo: *Pressão de vapor.*
- 11) Capítulo C.4 do presente anexo: *Biodegradabilidade «fácil»*
- 12) Capítulo C.29 do presente anexo: *Biodegradabilidade «fácil» — CO₂ em recipientes fechados*
- 13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102: 117-156.
- 14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.
- 15) OCDE (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- 16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4097-4102.
- 17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin to commercially available pelletized fish food. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2058-2062.
- 18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2', 5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicol. Sci.* 77: 206-218.
- 19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4: 139-155.
- 20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2436-2448.
- 21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. *Environmental Sciences Europe* 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

- 22) Capítulo C.47 do presente anexo: *Ensaio de toxicidade nos primeiros estádios de vida em peixes.*
- 23) Capítulo C.15 do presente anexo: *Ensaio de toxicidade de curto prazo nos peixes em estado embrionário e recém-nascidos.*
- 24) Capítulo C.14 do presente anexo: *Ensaio de crescimento juvenil em peixe.*
- 25) OCDE (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- 26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.
- 27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.
- 28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA
- 29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.
- 30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099-1105.
- 31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711-1718.
- 32) OCDE (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO (2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- 33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.
- 34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.
- 35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.
- 36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.
- 37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Å. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C₁₂- and C₁₆-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775-1782.
- 38) Anónimo (2004), Fish, dietary bioaccumulation study — Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- 39) Anónimo (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- 40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijnbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173-189.
- 41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829-833.

- 42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
 - 43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. *Toxicol. Sci.* 77: 219-229.
 - 44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5: 624-637.
 - 45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2769-2777.
 - 46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
 - 47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 951-961.
 - 48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2503-2517.
 - 49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.
 - 50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. *Environ. Sci. Technol.* 27: 1718-1728.
 - 51) OCDE (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I — Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II — Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
-

Apêndice 1

DEFINIÇÕES E UNIDADES

A eficiência de assimilação (α) é uma medida da quantidade relativa de substância absorvida pelo organismo a partir do intestino (não tem unidade, mas é muitas vezes expressa como percentagem em vez de fração).

A bioacumulação é geralmente referida como um processo no qual a concentração da substância num organismo atinge um nível que ultrapassa o que se verifica no meio respiratório (por exemplo, água para um peixe ou ar para um mamífero), na dieta, ou em ambos (1).

A bioconcentração consiste no aumento da concentração da substância em estudo num determinado organismo ou em determinados tecidos do mesmo, relativamente à respetiva concentração no meio circundante.

O fator de bioconcentração (BCF ou K_b) em qualquer momento da fase de fixação do ensaio de acumulação consiste no quociente entre a concentração da substância em estudo nos peixes ou em determinados tecidos dos mesmos (C_f expressa em mg/kg) e a respetiva concentração no meio circundante (C_w , expressa em mg/l). O BCF é expresso em l·kg⁻¹. Importa salientar que não são tidas em conta as correções em função do crescimento e/ou de um teor de lípidos normal.

A bioamplificação consiste no aumento da concentração da substância em estudo num determinado organismo ou em determinados tecidos do mesmo, relativamente à respetiva concentração nos alimentos.

O fator de bioamplificação (BMF) consiste na concentração de uma substância num predador em relação à concentração na presa (ou alimento) em estado estacionário. No método descrito no presente método de ensaio, evita-se cuidadosamente a exposição através da fase aquosa e, como tal, não é possível comparar diretamente um BMF deste método de ensaio com um BMF de um estudo de campo (que poderá combinar a exposição aquosa e a exposição por via alimentar).

O fator de bioamplificação por via alimentar (BMF por via alimentar) é o termo utilizado no presente método de ensaio para descrever o resultado do ensaio de exposição por via alimentar, no qual se evita cuidadosamente a exposição através da fase aquosa e, portanto, não é possível comparar diretamente o BMF por via alimentar deste método de ensaio com um BMF de um estudo de campo (que poderá combinar a exposição aquosa e a exposição por via alimentar).

A fase de depuração ou de pós-exposição consiste no período durante o qual se estuda a depuração da substância pelos peixes ou por tecidos específicos dos mesmos, na sequência da transferência dos animais de um meio que contenha a substância em estudo para um meio que a não contenha.

A constante de velocidade de depuração (k_2) é o valor numérico que define a velocidade de redução da concentração da substância em estudo nos peixes ou em determinados tecidos dos mesmos, na sequência da transferência dos animais de um meio que contenha a substância em estudo para um meio que a não contenha (a constante k_2 é expressa em dias⁻¹).

O carbono orgânico dissolvido (COD) é uma medida da concentração de carbono proveniente de fontes orgânicas dissolvidas nos meios de ensaio.

A fase de exposição ou de fixação consiste no tempo de exposição dos peixes à substância em estudo.

A taxa de ingestão de alimentos (I) é a quantidade média de alimentos ingeridos por cada peixe por dia, em relação ao peso corporal médio estimado dos peixes (expressa em termos de g alimento/g peixes/dia).

O fator de bioconcentração cinético (BCF_k) é o rácio entre a constante de velocidade de fixação, k_1 , e a constante de velocidade de depuração, k_2 (isto é, k_1/k_2 — ver as definições correspondentes no presente apêndice). Em princípio, o valor deve ser comparável com o BCF_{ss} (ver definição supra), mas podem ocorrer desvios se o estado estacionário não tiver sido bem definido ou caso se tenham aplicado correções em função do crescimento ao BCF cinético.

O fator de bioconcentração cinético normalizado em função dos lípidos (BCF_{kl}) é normalizado em relação a um peixe com um teor de lípidos de 5 %.

O fator de bioconcentração cinético corrigido em função do crescimento e normalizado em função dos lípidos (BCF_{kgl}) é normalizado em relação a um peixe com um teor de lípidos de 5 % e corrigido em função do crescimento durante o período de estudo, tal como descrito no apêndice 5.

O fator de bioconcentração do estado estacionário normalizado em função dos lípidos (BCF_{ssl}) é normalizado em relação a um peixe com um teor de lípidos de 5 %.

Uma substância multicomponentes é definida, para efeitos do REACH, como uma substância com mais do que um componente principal presente numa concentração entre 10 % e 80 % (p/p).

O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) consiste no quociente entre a solubilidade de uma substância em *n*-octanol e em água, em condições de equilíbrio (métodos A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)); também é expresso como P_{ow} . O logaritmo de K_{ow} é utilizado como indicador do potencial de bioconcentração de uma substância em organismos aquáticos.

O carbono orgânico particulado (COP) é uma medida da concentração de carbono decorrente de fontes orgânicas suspensas nos meios de ensaio.

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica analítica sem solventes desenvolvida para sistemas diluídos. Neste método, uma fibra revestida por um polímero é exposta à fase gasosa ou líquida com o analito de interesse. Em geral, impõe-se um tempo de análise mínimo para que se estabeleçam condições de equilíbrio entre as fases sólida e fluida, no que se refere à espécie medida. Subsequentemente, a concentração do analito de interesse pode ser diretamente determinada a partir da fibra ou após a sua extração da fibra para um solvente, consoante a técnica de determinação.

Um estado estacionário é atingido sempre que a representação gráfica da concentração da substância em estudo nos peixes (C_f) em função do tempo consista numa linha paralela ao eixo dos tempos e três determinações sucessivas de C_f em amostras recolhidas com intervalos de, pelo menos, dois dias, apresentem valores que não difiram em mais de 20 %, na ausência de diferenças significativas entre a primeira e a última análises sucessivas. No caso das amostras combinadas, são necessárias, pelo menos, quatro análises sucessivas. No caso de substâncias cuja fixação é lenta, o intervalo mais adequado é de sete dias.

O fator de bioconcentração num estado estacionário (BCF_{ss}) não sofre uma alteração significativa num período longo, uma vez que a concentração da substância em estudo no meio circundante é constante no período em causa (cf. definição de estado estacionário).

O carbono orgânico total (COT) é uma medida da concentração de carbono decorrente de todas as fontes orgânicas nos meios de ensaio, incluindo as fontes particuladas e dissolvidas.

A constante de velocidade de fixação (k_1) é o valor numérico que define a taxa de aumento da concentração da substância em estudo nos peixes ou em determinados tecidos dos mesmos, sempre que se encontrem expostos à substância em causa (a constante k_1 é expressa em $l\ kg^{-1}\ dia^{-1}$).

As substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos e materiais biológicos são denominados UVCB.

Um produto químico é uma substância ou mistura.

Um produto químico em estudo é qualquer substância ou mistura ensaiada por recurso ao presente método de ensaio.

REFERÊNCIAS

- 1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. e Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

- 2) Capítulo A.8 do presente anexo, *Coefficiente de partição (n-octanol/água): Método de agitação do recipiente*
 - 3) Capítulo A.24 do presente anexo, *Coefficiente de partição (n-octanol/água), Método de HPLC.*
 - 4) Capítulo A.23 do presente anexo, *Coefficiente de partição (1-octanol/água): Método de agitação lenta.*
-

Apêndice 2

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

Componente	Concentração limite
Partículas	5 mg/l
Carbono orgânico total	2 mg/l
Amoníaco não ionizado	1 µg/l
Cloro residual	10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	50 ng/l
Total de pesticidas organoclorados + bifenilos policlorados	50 ng/l
Cloro orgânico total	25 ng/l
Alumínio	1 µg/l
Arsénio	1 µg/l
Crómio	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Cobre	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
Chumbo	1 µg/l
Níquel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cádmio	100 ng/l
Mercúrio	100 ng/l
Prata	100 ng/l

Apêndice 3

ESPÉCIES DE PEIXES RECOMENDADAS PARA OS ENSAIOS

Espécies recomendadas	Gama de temperaturas de ensaio recomendadas (°C)	Comprimento recomendado dos animais de ensaio (cm) ⁽²⁾
<i>Danio rerio</i> ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Peixe-zebra	20 - 25	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Vairão-de-cabeça-grande	20 - 25	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Carpa comum	20 - 25	8,0 ± 4,0 ⁽³⁾
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck e Schlegel) Peixinho-dos-arrozais	20 - 25	4,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Gupi	20 - 25	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Perca-azul	20 - 25	5,0 ± 2,0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Truta-arco-íris	13 - 17	8,0 ± 4,0
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Esgana-gata	18 - 20	3,0 ± 1,0

⁽¹⁾ Meyer *et al.* (1)

⁽²⁾ Importa salientar que no ensaio em si o peso é a medida preferível para derivações da constante de velocidade de crescimento e de dimensão. Todavia, reconhece-se que o comprimento é uma medida mais prática se for necessário selecionar os peixes a olho no início de uma experiência (*ou seja*, a partir da população de reserva).

⁽³⁾ A gama de comprimentos encontra-se indicada no documento *Testing Methods for New Chemical Substances* etc., baseado na lei relativa ao controlo das produtos químicos do Japão.

Diversas espécies estuarinas e marinhas foram utilizadas com menor frequência, nomeadamente:

Roncadeira-de-pinta	(<i>Leiostomus xanthurus</i>)
Sargo-choupa	(<i>Cyprinodon variegatus</i>)
Peixe-rei	(<i>Menidia beryllina</i>)
Perca-brilhante	(<i>Cymatogaster aggregata</i>)
Solha-inglesa	(<i>Parophrys vetulus</i>)
Peixe-escorpião-armado	(<i>Leptocottus armatus</i>)
Esgana-gata	(<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
Robalo	(<i>Dicentrarchus labrax</i>)
Alburno	(<i>Alburnus alburnus</i>)

Os peixes de água doce referidos no quadro supra são de fácil reprodução, encontrando-se disponíveis todo o ano, ao passo que a disponibilidade de algumas das espécies marinhas e estuarinas se encontra limitada a determinados países. Os peixes de água doce podem ser criados em explorações piscícolas ou no laboratório, em condições controladas no que respeita a doenças e parasitas, de modo a produzir animais saudáveis com uma linha parental conhecida. Estas espécies encontram-se disponíveis em várias partes do mundo.

REFERÊNCIAS

- 1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

Apêndice 4

CALENDRÁRIOS DE AMOSTRAGEM PARA ENSAIOS DE EXPOSIÇÃO AQUOSA E POR VIA ALIMENTAR

1. Exemplo teórico de um calendário de amostragem para um ensaio completo de bioconcentração de exposição aquosa com $\log K_{ow} = 4$.

Recolha de amostras de peixes	Calendário de amostragem		Número de amostras de água ⁽¹⁾	Número de peixes por amostra ⁽¹⁾
	Frequência mínima necessária (dias) ⁽²⁾	Recolha de amostras adicionais (dias) ⁽²⁾		
Fase de fixação				
1	-1		2 ⁽³⁾	4 ⁽⁴⁾
	0		(2)	(3 ⁽⁶⁾)
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4 - 8 ⁽⁵⁾
				(3 ⁽⁶⁾)
Fase de depuração				Transferência dos peixes para uma célula com água isenta da substância em estudo
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)

Recolha de amostras de peixes	Calendário de amostragem		Número de amostras de água ⁽¹⁾	Número de peixes por amostra ⁽¹⁾
	Frequência mínima necessária (dias) ⁽²⁾	Recolha de amostras adicionais (dias) ⁽²⁾		
Fase de fixação				
10	14,0		2	4 - 8 ⁽⁵⁾
		17,5		(4 + 3 ⁽⁶⁾)
TOTAL				40 - 72 (48 - 80) ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Os valores entre parêntesis correspondem ao número de amostras de água e de peixes a recolher caso se proceda a uma amostragem suplementar.

⁽²⁾ O valor estimado de k_2 para $\log K_{OW} = 4,0$ é de 0,652 dias⁻¹. A duração total do ensaio é dada por: $3 \times t_{ss} = 3 \times 4,6$ dias, ou seja, 14 dias. Para o cálculo de t_{ss} , consultar o apêndice 5.

⁽³⁾ Recolher as amostras de água após, pelo menos, três renovações do volume da célula.

⁽⁴⁾ Estes peixes são recolhidos para amostra a partir da população de reserva.

⁽⁵⁾ Caso sejam necessários estudos de metabolismo ou de precisão mais elevada que necessitem de um número mais elevado de peixes, estes devem ser recolhidos para amostra especificamente no final das fases de fixação e de depuração (cf. ponto 40).

⁽⁶⁾ Podem ser necessários, pelo menos, 3 peixes adicionais para efeitos de análise do teor de lípidos, caso não seja possível utilizar os mesmos peixes recolhidos para determinação das concentrações da substância no início do ensaio, no final da fase de fixação e no final da fase de depuração. Importa salientar que, em muitos casos, deverá ser possível utilizar apenas três peixes do lote de controlo (cf. ponto 56).

2. Exemplo teórico de calendário de amostragem para um ensaio de bioacumulação por via alimentar da substância após uma fase de fixação de 10 dias e uma fase de depuração de 42 dias.

Colheita de amostra	Calendário de amostragem		Número de amostras de alimento	Número de peixes por amostra	
	Dia da fase	Amostras adicionais de peixes?		Grupo de ensaio	Grupo de controlo
Fase de fixação					
1	0	Possível ⁽¹⁾ ⁽²⁾	3 — grupo de ensaio	0	5 — 10
			3 — grupo de controlo ⁽¹⁾		(8 — 13) ⁽²⁾
1A ⁽³⁾	1-3			5 - 10	5 - 10
2	10	Sim ⁽⁴⁾	3 — grupo de ensaio	10 - 15 ⁽⁴⁾	5 - 10
			3 — grupo de controlo ⁽¹⁾	(13 - 18) ⁽⁵⁾	(8 - 13) ⁽⁵⁾
Fase de depuração					
3	1	Sim ⁽⁴⁾		10 - 15 ⁽⁴⁾	5 - 10
4	2			5 - 10	5 - 10
5	4			5 - 10	5 - 10

Colheita de amostra	Calendário de amostragem		Número de amostras de alimento	Número de peixes por amostra	
	Dia da fase	Amostras adicionais de peixes?		Grupo de ensaio	Grupo de controlo
Fase de fixação					
6	7	Sim ⁽⁴⁾		10 - 15 ⁽⁴⁾	5 - 10
7	14			5 - 10	5 - 10
8	28			5 - 10	5 - 10
9	42	Sim ⁽⁴⁾		10 - 15 ⁽⁴⁾ (13 - 18) ⁽⁵⁾	5 - 10 (8 - 13) ⁽⁵⁾
TOTAL				59 - 120 (63 - 126) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾	50 - 110 (56 - 116) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Três amostras de alimento dos grupos de controlo e de ensaio analisadas para determinar as concentrações da substância em estudo e o teor de lípidos.

⁽²⁾ Os peixes são recolhidos para amostra a partir da população de ensaio, o mais perto possível do início do estudo; devem ser recolhidos para amostra, pelo menos, três peixes da população de reserva no início do ensaio, para determinar o teor de lípidos.

⁽³⁾ A recolha (facultativa) de amostras no início da fase de fixação fornece dados para calcular a assimilação alimentar da substância em estudo, que pode ser comparada com a eficiência de assimilação calculada a partir dos dados da fase de depuração.

⁽⁴⁾ Podem recolher-se cinco peixes adicionais para efeitos de análise específica dos tecidos.

⁽⁵⁾ Podem ser necessários, pelo menos, 3 peixes adicionais para efeitos de análise do teor de lípidos, caso não seja possível utilizar os mesmos peixes recolhidos para determinação das concentrações da substância no início do ensaio, no final da fase de fixação e no final da fase de depuração. Importa salientar que, em muitos casos, deve ser possível utilizar apenas três peixes do lote de controlo (cf. pontos 56 e 153).

Nota relativa à duração das fases e ao calendário de amostragem: A fase de fixação tem início com a primeira alimentação enriquecida. Um dia experimental tem início com uma alimentação e termina pouco antes da seguinte, 24 horas depois. A primeira colheita de amostra (1 no quadro) deve ocorrer pouco antes (por exemplo, uma hora) da primeira alimentação. Idealmente, a colheita de amostras durante um estudo deve ser efetuada pouco antes da alimentação do dia seguinte (*ou seja*, cerca de 23 horas após a alimentação do dia de recolha de amostras). A fase de fixação termina pouco antes da primeira alimentação com dieta não enriquecida, quando a fase de depuração tem início (é provável que os peixes do grupo de ensaio ainda se encontrem a digerir alimento enriquecido nas 24 horas seguintes à última alimentação com a dieta enriquecida). Assim, a amostra no final da fixação deve ser colhida pouco antes da primeira alimentação com a dieta não enriquecida e a primeira amostra da fase de depuração deve ser recolhida cerca de 23 horas após a primeira alimentação não enriquecida.

Apêndice 5

CÁLCULOS GERAIS

1. Introdução
2. Estimativa da duração da fase de fixação
3. Estimativa da duração da fase de depuração
4. Método sequencial: determinação da constante de velocidade de depuração, k_2
5. Método sequencial: determinação da constante de velocidade de fixação k_1 (apenas no método de exposição por via aquosa)
6. Método simultâneo para o cálculo das constantes de velocidade de fixação e de depuração (apenas para o método de exposição POR VIA aquosa)
7. Correção em função da diluição de crescimento para o BMF e o BCF cinético
8. Normalização dos lípidos para um teor de lípidos de 5 % (apenas no método de exposição aquosa)

1. INTRODUÇÃO

É possível descrever o modelo geral de bioacumulação aquática nos peixes em termos de processos de fixação e de depuração, ignorando a fixação com alimentação. A equação diferencial (dC_f/dt) que descreve a taxa de variação na concentração nos peixes ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$) é a seguinte (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{Equação A5.1}]$$

Em que,

k_1 = Constante de velocidade de primeira ordem para a fixação nos peixes ($\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$).

k_2 = Constante de velocidade de primeira ordem para a depuração dos peixes (dia^{-1}).

k_g = Constante de velocidade de primeira ordem para o crescimento dos peixes («diluição de crescimento») (dia^{-1})

k_m = Constante de velocidade de primeira ordem para a transformação metabólica (dia^{-1})

k_e = Constante de velocidade de primeira ordem para a egestão fecal (dia^{-1})

C_w = Concentração na água ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

C_f = Concentração nos peixes ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ massa húmida).

No que se refere às substâncias bioacumuláveis, é previsível que uma média ponderada no tempo (TWA) constitua a concentração de exposição mais relevante em água (C_w) no intervalo de flutuação permitido (cf. ponto 24). Recomenda-se o cálculo de uma TWA da concentração na água em conformidade com o procedimento constante do apêndice 6 do método C.20 (2). Importa salientar que o logaritmo natural da concentração na água é adequado quando se prevê uma queda exponencial entre períodos de renovação, por exemplo, num ensaio de concepção semiestática. Num sistema dinâmico, pode não ser necessário o logaritmo natural das concentrações de exposição. Caso se obtenham os valores médios ponderados no tempo das concentrações em água, estes devem ser registados e utilizados nos cálculos subsequentes.

Num ensaio normal do BCF nos peixes, a fixação e a depuração podem ser descritas em termos de dois processos cinéticos de primeira ordem.

$$\text{Taxa de fixação} = k_1 \times C_w \quad [\text{Equação A5.2}]$$

$$\text{Taxa de perda global} = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{Equação A5.3}]$$

No estado estacionário, pressupondo que o crescimento e o metabolismo são insignificantes (*ou seja*, não é possível distinguir os valores de k_g e k_m de zero), a velocidade de fixação é igual à velocidade de depuração, pelo que, combinando a equação A5.2 com a equação A5.3, se obtém o seguinte:

$$\text{BCF} = \frac{C_f - SS}{C_w - SS} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Equação A5.4}]$$

Em que

C_{f-SS} = concentração nos peixes em estado estacionário (mg kg^{-1} massa húmida).

C_{w-SS} = concentração na água no estado estacionário (mg l^{-1}).

O rácio k_1/k_2 é conhecido por BCF cinético (BCF_k) e deve ser igual ao BCF do estado estacionário (BCF_{ss}) obtido a partir do rácio entre a concentração nos peixes em estado estacionário e na água, mas podem verificar-se desvios caso o estado estacionário não for bem definido ou se tenham aplicado ao BCF cinético correções em função do crescimento. Todavia, uma vez que k_1 e k_2 são constantes, não é necessário atingir o estado estacionário para obter um BCF_k .

O presente apêndice inclui, com base nestas equações de primeira ordem, os cálculos gerais necessários para os métodos de bioacumulação da exposição aquosa e por via alimentar. Contudo, as secções 5, 6 e 8 são relevantes apenas para o método de exposição aquosa, sendo, todavia, incluídas neste apêndice porque constituem técnicas gerais. Os métodos sequencial (secções 4 e 5) e simultâneo (secção 6) permitem o cálculo das constantes de fixação e de depuração utilizadas para obter os BCF cinéticos. O método sequencial para determinar k_2 (secção 4) é importante no contexto do método por via alimentar, uma vez que é necessário ao cálculo tanto da eficiência de assimilação como do BMF. O apêndice 7 apresenta em pormenor os cálculos específicos do método por via alimentar.

2. ESTIMATIVA DA DURAÇÃO DA FASE DE FIXAÇÃO

Antes de realizar o ensaio, pode obter-se uma estimativa de k_2 e, consequentemente, do tempo necessário para atingir o estado estacionário, com base em relações empíricas entre k_2 e o coeficiente de partição *n*-octanol/água (K_{OW}) ou entre k_1 e o BCF. Contudo, é necessário ter consciência de que as equações apresentadas na presente secção são aplicáveis apenas quando a fixação e a depuração seguem uma cinética de primeira ordem. Caso seja evidente que tal não se verifica, recomenda-se que se solicite o parecer de um perito em bioestatística e/ou farmacocinética, caso se pretendam estimativas da fase de fixação.

É possível obter uma estimativa de k_2 (dia^{-1}) através de vários métodos. No primeiro caso, podem utilizar-se, por exemplo, as seguintes relações empíricas ⁽¹⁾:

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \log K_{OW} \quad (r^2=0,95) [(3); \text{Equação A5.5}]$$

ou

$$k_2 = \frac{k_1}{\text{BCF}} \quad [\text{Equação A5.6}]$$

$$\text{Em que, } k_1 = 520 \times W^{-0,32} \text{ (para substâncias com } \log K_{OW} > 3) \quad (r^2=0,85) [(4); \text{Equação A5.7}]$$

$$\text{E } \text{BCF} = 10^{(0,910 \cdot \log K_{OW} - 1,975 \cdot \log(6,8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0,786)} \quad (r^2=0,90) [(5); \text{Equação A5.8}]$$

⁽¹⁾ Tal como qualquer relação empírica, deve verificar-se que a substância em estudo se insere no domínio de aplicabilidade da relação.

W = peso médio dos peixes tratados (massa húmida em gramas) no final da fixação/início da depuração ⁽¹⁾

Para outras relações conexas, ver (6). Pode ser vantajoso utilizar modelos mais complexos para obter a estimativa de k_2 caso, por exemplo, seja provável a ocorrência de metabolismo numa extensão significativa (7) (8). Porém, à medida que a complexidade do modelo aumenta, é necessária maior prudência na interpretação das estimativas. Por exemplo, a presença de grupos nitro pode indicar um metabolismo rápido, mas nem sempre é esse o caso. Portanto, na calendarização de um estudo, o utilizador deve ponderar os resultados do método de estimativa em função da estrutura química e de quaisquer outras informações relevantes (por exemplo, estudos preliminares).

Pode calcular-se o tempo necessário para atingir uma determinada percentagem do estado estacionário a partir do valor de k_2 estimado, com base na equação cinética que descreve a fixação e a depuração (assumindo uma cinética de primeira ordem), partindo do princípio de que o crescimento e o metabolismo são insignificantes. Caso ocorra um crescimento significativo durante o estudo, as estimativas descritas infra não serão fiáveis. Nestes casos, é melhor utilizar o valor k_{2g} corrigido em função do crescimento, como descrito adiante (secção 7 do presente apêndice):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f \quad [\text{Equação A5.9}]$$

ou, para C_w constante:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Equação A5.10}]$$

Na vizinhança do estado estacionário ($t \rightarrow \infty$), a equação A5.10 pode reduzir-se — cf. (9) (10) — a:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad [\text{Equação A5.11}]$$

ou

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \quad [\text{Equação A5.12}]$$

O valor $BCF \times C_w$ constitui uma aproximação da concentração nos peixes no estado estacionário (C_{f-ss}). [Nota: esta metodologia pode ser utilizada na estimativa do BMF do estado estacionário com o ensaio por via alimentar. Neste caso, o BCF é substituído pelo BMF e C_w por C_{alimento} — concentração no alimento — nas equações supra]

A equação A5.10 pode transformar-se em:

$$C_f = C_{f-ss} (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Equação A5.13}]$$

ou

$$\frac{C_f}{C_{f-ss}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Equação A5.14}]$$

Aplicando a equação A5.14, pode prever-se o tempo necessário para atingir uma determinada percentagem do estado estacionário, utilizando o valor de k_2 determinado pela equação A5.5 ou pela equação A5.6.

Do ponto de vista estatístico, a duração ótima da fase de fixação para obter dados estatísticos fiáveis (BCF_k) consiste no período necessário para que a curva decorrente da representação gráfica do logaritmo da concentração da substância em estudo nos peixes em função do tempo, numa escala aritmética, atinja pelo menos 50 % do estado estacionário (ou seja, $0,69/k_2$, mas não mais de 95 % do estado estacionário (ou seja, $3,0/k_2$) (11). O cálculo do BCF_{ss} torna-se possível se a bioacumulação atingir um valor superior a 95 % do estado estacionário.

⁽¹⁾ O peso dos peixes no final da fase de fixação pode ser estimado a partir de dados de estudos anteriores ou de conhecimento prévio sobre o aumento provável da dimensão da espécie de ensaio a partir de um peso normal no início do ensaio ao longo de uma fase de fixação normal (por exemplo, 28 dias).

Utilizando a equação A5.14, o tempo necessário para atingir 80 % do estado estacionário é dado por:

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Equação A5.15}]$$

ou

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \quad [\text{Equação A5.16}]$$

De modo semelhante, o tempo necessário para atingir 95 % do estado estacionário é:

$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \quad [\text{Equação A5.17}]$$

Por exemplo, para uma substância em estudo com $\log K_{OW} = 4$, a duração da fase de fixação (*ou seja*, o tempo necessário para atingir uma determinada percentagem do estado estacionário, por exemplo, t_{80} ou t_{95}), utilizando a equação A5.5, a equação A5.16 e a equação A5.17, é:

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ dia}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \text{ dias (59 horas)}$$

$$\text{ou } t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60 \text{ dias (110 horas)}$$

Como alternativa,

$$t_{\text{ess}} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55,31 \text{ (horas)} \quad [\text{Equação A5.18}]$$

$$t_{\text{ess}} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121 \text{ horas}$$

Para o cálculo do tempo necessário para atingir o estado estacionário real, t_{ess} (12), pode utilizar-se a expressão infra. No caso de uma substância em estudo com $\log K_{OW} = 4$, obtém-se:

3. ESTIMATIVA DA DURAÇÃO DA FASE DE DEPURAÇÃO

Com base na equação geral que descreve a fixação e a depuração, pressupondo uma cinética de primeira ordem, pode obter-se uma estimativa do tempo necessário para reduzir a carga corporal a uma determinada percentagem da concentração inicial (*cf.* equação A5.9 (1) (13)).

Para a fase de depuração, pressupõe-se que o valor C_w (ou C_{alimento} para o ensaio por via alimentar) é zero. Assim, a equação pode ser reduzida a:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \quad [\text{Equação A5.19}]$$

ou

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad [\text{Equação A5.20}]$$

em que $C_{f,0}$ representa a concentração no início do período de depuração.

O tempo necessário para atingir 50 % da depuração (t_{50}) é dado por:

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

ou

$$t_{50} = \frac{-\ln(0,50)}{k_2} = \frac{0,693}{k_2}$$

Do mesmo modo, o tempo necessário para atingir 95 % de depuração será:

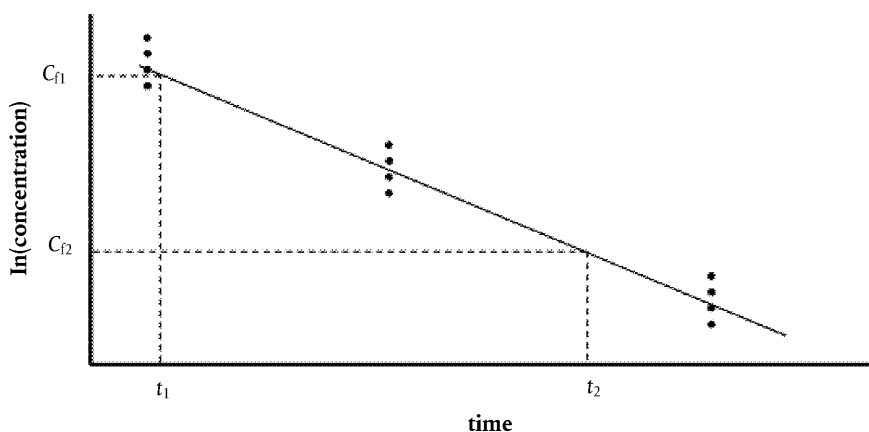
$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2}$$

Caso se utilize um valor correspondente a 80 % da fixação no primeiro período ($1,6/k_2$) e a 95 % da depuração na fase respetiva ($3,0/k_2$), a duração da fase de depuração é aproximadamente o dobro da duração da fase de fixação.

Saliente-se que as estimativas em causa apenas são válidas para perfis de fixação e depuração que sigam uma cinética de primeira ordem. Caso seja evidente que tal não sucede, estas estimativas não são válidas.

4. MÉTODO SEQUENCIAL: DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE VELOCIDADE DE DEPURAÇÃO, K_2

Considera-se que a maioria dos dados referentes à bioconcentração são razoavelmente descritos por recurso a um modelo simples do tipo «dois compartimentos/dois parâmetros», baseado na linearidade da curva obtida das concentrações nos peixes (numa escala ln) durante a fase de depuração.



De sublinhar que os desvios a uma linha reta podem indicar um perfil de depuração mais complexo do que uma cinética de primeira ordem. Para abordar tipos de depuração que se desviem de uma cinética de primeira ordem, pode aplicar-se o método gráfico.

Para calcular o valor k_2 para vários pontos de amostragem, deve realizar-se uma regressão linear do logaritmo natural da concentração em função do tempo. O declive da linha obtida constitui uma estimativa da constante de velocidade de depuração k_2 ⁽¹⁾. A partir da ordenada na origem, a concentração média nos peixes no início da fase de depuração ($C_{0,d}$, que é igual à concentração média nos peixes no final da fase de fixação) pode ser facilmente calculada (incluindo margens de erro) ⁽¹⁾:

$$C_{0,d} = e^{\text{ord. origem}}$$

[Equação A5.21]

⁽¹⁾ Na maioria dos programas de regressão linear, apresentam-se também os erros-padrão e o intervalo de confiança (IC) das estimativas (caso, por exemplo, do Microsoft Excel, recorrendo ao conjunto de ferramentas Data Analysis).

Para calcular o valor k_2 quando se encontram disponíveis apenas dois pontos (de amostragem) (como na conceção minimizada), as duas concentrações médias devem ser substituídas pela seguinte equação

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \quad [\text{Equação A5.22}]$$

Em que $\ln(C_{f1})$ e $\ln(C_{f2})$ são os logaritmos naturais das concentrações nos pontos t_1 e t_2 , respetivamente, e t_2 e t_1 são os pontos em que as duas amostras foram recolhidas em relação ao início da depuração ⁽¹⁾.

5. MÉTODO SEQUENCIAL: DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE VELOCIDADE DE FIXAÇÃO K_1 (APENAS NO MÉTODO DE EXPOSIÇÃO POR VIA AQUOSA)

Para determinar um valor de k_1 a partir de uma série sequencial de dados tempo/concentração para a fase de fixação, deve recorrer-se a um programa informático que utilize o seguinte modelo:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Equação A5.23}]$$

Em que k_2 é dado pelo cálculo anterior $C_f(t)$ e $C_w(t)$ são as concentrações nos peixes e na água, respetivamente, no ponto t .

Para calcular o valor de k_1 quando se dispõe apenas de dois pontos de amostragem (como na conceção minimizada), utiliza-se a seguinte fórmula:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{Equação A5.24}]$$

Em que k_2 é dado pelo cálculo anterior, C_f é a concentração nos peixes no início da fase de depuração e C_w é a concentração média na água durante a fase de fixação ⁽²⁾.

Pode proceder-se à inspeção visual dos declives k_1 e k_2 representados num gráfico em função dos dados relativos aos pontos de amostragem medidos para avaliar a adequação do ajustamento. Caso se verifique que o método sequencial não produziu uma boa estimativa do valor k_1 , deve aplicar-se a metodologia simultânea para calcular os valores k_1 e k_2 (ver a secção 6 infra). Novamente, os declives resultantes devem ser comparados com a representação gráfica dos dados medidos para efeitos de inspeção visual da adequação do ajustamento. Caso o ajustamento ainda não seja adequado, isso pode indicar que a cinética não é de primeira ordem e que se devem utilizar outros modelos mais complexos.

6. MÉTODO SIMULTÂNEO PARA O CÁLCULO DAS CONSTANTES DE VELOCIDADE DE FIXAÇÃO E DE DEPURAÇÃO (APENAS PARA O MÉTODO DE EXPOSIÇÃO POR VIA AQUOSA)

Podem utilizar-se programas informáticos para obter valores para k_1 e k_2 a partir de uma série sequencial de dados tempo/concentração, aplicando o seguinte modelo teórico:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{Equação A5.25}]$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{Equação A5.26}]$$

em que

t_c = tempo decorrido até ao final da fase de fixação.

⁽¹⁾ Ao contrário do que se verifica no método de regressão linear, o recurso a esta fórmula não permite obter um erro-padrão para k_2 .

⁽²⁾ Ao contrário do que se verifica num modelo de regressão linear, em regra, este método não produzirá um erro-padrão nem um intervalo de confiança para o valor k_1 estimado.

Esta metodologia fornece diretamente os erros-padrão das estimativas de k_1 e k_2 . Se, nas equações A5.25 e A5.26, k_1/k_2 for substituído pelo BCF (cf. equação A5.4), é possível estimar igualmente o erro-padrão e o IC de 95 % do BCF. O que precede é de especial utilidade na comparação de diferentes estimativas devido à transformação dos dados. A variável dependente (concentração nos peixes) pode ser ajustada com ou sem o logaritmo natural e é possível avaliar a incerteza do BCF daí resultante.

Uma vez que existe uma forte correlação entre os dois parâmetros k_1 e k_2 , se os mesmos forem estimados simultaneamente pode ser recomendável calcular em primeiro lugar o valor k_2 apenas a partir dos dados de depuração (ver supra); este valor pode, na maioria dos casos, ser estimado a partir da curva de depuração com uma precisão relativamente elevada. O valor k_1 pode ser subsequentemente calculado a partir dos dados de fixação, por regressão não linear ⁽¹⁾. Recomenda-se o recurso à mesma transformação dos dados no ajustamento sequencial.

Pode proceder-se à inspeção visual dos declives resultantes se representados num gráfico em função dos dados relativos aos pontos de amostragem medidos para avaliar a adequação do ajustamento. Caso se verifique que este método não produziu uma boa estimativa do valor k_1 , pode aplicar-se a metodologia simultânea para calcular os valores k_1 e k_2 . Também aqui, o modelo ajustado deve ser comparado com a representação gráfica dos dados medidos com vista à inspeção visual da adequação do ajustamento e das estimativas de parâmetros resultantes para k_1 , k_2 ; o BCF resultante e os respetivos erros-padrão e/ou intervalos de confiança devem ser comparados entre os diferentes tipos de ajustamento.

Caso a adequação do ajustamento seja fraca, pode indiciar que não é aplicável uma cinética de primeira ordem e de que se devem utilizar outros modelos mais complexos. Uma das complicações mais comuns é o crescimento dos peixes durante o ensaio.

7. CORREÇÃO EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO DE CRESCIMENTO PARA O BMF E O BCF CINÉTICO

A presente secção descreve um método normalizado (denominado «diluição de crescimento») para a correção devido ao crescimento dos peixes durante o ensaio, que é válido apenas se a cinética for de primeira ordem. Caso existam indícios de que tal não sucede, recomenda-se que se solicite o parecer de um perito em bioestatística para uma correção adequada em função da diluição de crescimento, ou que se utilize a metodologia baseada na massa descrita infra.

Por vezes, o método de correção em função da diluição de crescimento carece de precisão, podendo mesmo não ser adequado (por exemplo, no caso de substâncias de depuração muito lenta ensaiadas em peixes de crescimento rápido, a constante de velocidade de depuração obtida corrigida em função da diluição de crescimento, k_{2g} , pode ser muito reduzida, pelo que o erro nas duas constantes de velocidade utilizadas para a obter se torna crítico; por vezes, as estimativas do valor k_g podem ser superiores a k_2). Nestes casos, é possível utilizar uma metodologia alternativa (metodologia baseada na massa), que também funciona quando a cinética não é de primeira ordem, o que evita a necessidade de correção. Esta metodologia é descrita no final da presente secção.

Método de subtração da constante de velocidade de crescimento para efeitos de correção em função do crescimento

No caso do método normalizado, todos os dados relativos ao peso e comprimento individual são convertidos em logaritmos naturais e $\ln(\text{peso})$ ou $\ln(1/\text{peso})$ é representado graficamente em função do tempo (dia), separadamente para os grupos de tratamento e de controlo. Aplica-se o mesmo processo, separadamente, aos dados das fases de fixação e de depuração. Em regra, para fins de correção em função da diluição de crescimento, é mais adequado utilizar os dados relativos ao peso de todo o estudo para obter a constante de velocidade de crescimento (k_g), mas a ocorrência de diferenças estatisticamente significativas entre as constantes de velocidade de crescimento obtidas para a fase de fixação e de depuração pode indicar a necessidade de utilizar a constante de velocidade da fase de depuração. É possível utilizar as taxas de crescimento global dos estudos aquosos para os grupos de ensaio e de controlo para determinar a ocorrência de efeitos relacionados com o tratamento.

⁽¹⁾ É necessário estar consciente de que a incerteza na estimativa de k_2 não é utilizada de modo adequado no modelo de bioacumulação de for essencialmente considerada uma constante no ajustamento de k_1 no método de ajustamento sequencial. Portanto, a incerteza resultante relativa ao BCF será diferente entre os métodos de ajustamento simultâneo e sequencial.

Aplica-se uma correlação linear dos mínimos quadrados ao logaritmo natural do peso dos peixes em função do dia (e para $\ln(1/\text{peso})$ em função do dia), para cada grupo (grupos de controlo e de ensaio(s), dados individuais e não valores médios diários) e para o estudo na sua globalidade, isto é, as fases de fixação e de depuração, por métodos estatísticos normalizados. Calculam-se as variâncias nos declives das linhas, que são utilizadas para avaliar a significância estatística ($p = 0,05$) da diferença nos declives (constantes de velocidade de crescimento), através do teste t de Student (ou por análise ANOVA, caso se proceda ao ensaio de mais do que uma concentração). Em geral, os dados relativos ao peso são preferíveis para fins de correção em função do crescimento. Os dados relativos ao comprimento, tratados da mesma forma, podem ser úteis para comparar os grupos de controlo e de ensaio no que se refere a efeitos relacionados com o tratamento. Caso não se observe uma diferença estatisticamente significativa na análise dos dados relativos ao peso, os dados de ensaio e de controlo podem ser combinados e pode calcular-se uma constante de velocidade de crescimento global dos peixes para o estudo (k_g), que é o declive global da correlação linear. Caso se observem diferenças estatisticamente significativas, as constantes de velocidade de crescimento são registadas separadamente para cada grupo de peixes e/ou cada fase do estudo. A constante de velocidade de cada grupo tratado deve ser utilizada para efeitos de correção em função da diluição de crescimento desse grupo. Se se observarem diferenças estatísticas entre as constantes de velocidade das fases de fixação e de depuração, devem utilizar-se as constantes de velocidade obtidas na fase de depuração.

Para obter a constante de velocidade de depuração, k_{2g} , pode subtrair-se a constante de velocidade de crescimento calculada (k_g , expressa em dia^{-1}) à constante de velocidade de depuração global (k_2).

$$k_{2g} = k_2 - k_g \quad [\text{Equação A5.27}]$$

A constante de velocidade de fixação é dividida pela constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento para obter o BCF cinético corrigido em função do crescimento, denominado BCF_{kg} (ou BMF_{kg}).

$$\text{BCF}_{kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \quad [\text{Equação A5.28}]$$

A constante de velocidade de crescimento obtida para um estudo por via alimentar é utilizada na equação A7.5 para calcular o BMF_{kg} corrigido em função do crescimento (cf. apêndice 7).

Método de correção em função do crescimento com base na massa

Descreve-se de seguida, uma alternativa ao método de subtração da constante de velocidade de crescimento supra que evita a necessidade da correção em função do crescimento. O princípio consiste em utilizar dados de depuração com base na massa, por peixe inteiro, em vez dados baseados na concentração.

As concentrações nos tecidos na fase de depuração (massa da substância em estudo/unidade de massa dos peixes) devem ser convertidas na massa da substância em estudo/peixes: devem fazer-se corresponder, num quadro, as concentrações e o peso individual dos peixes (por exemplo, recorrendo a uma folha de cálculo informática) e multiplicar cada concentração pelo peso total dos peixes, para que essa medição dê origem a um conjunto de massa da substância em estudo/peixes para todas as amostras da fase de depuração.

De seguida, representa-se graficamente o logaritmo natural resultante dos dados relativos à massa da substância em função do tempo, para a fase de depuração da experiência tal como seria normalmente realizada.

No que respeita ao método de exposição por via aquosa, deve obter-se normalmente a constante de velocidade de fixação (ver secções 4 e 6; importa salientar que se deve utilizar o valor k_2 «normal» nas equações de ajustamento das curvas para k_1) e a constante de velocidade de depuração a partir dos dados supra. Uma vez que — por ter sido obtido com base na massa por peixe inteiro — o valor resultante para a constante de velocidade de depuração é independente do crescimento, deve denominar-se k_{2g} e não k_2 .

8. NORMALIZAÇÃO DOS LÍPIDOS PARA UM TEOR DE LÍPIDOS DE 5 % (APENAS NO MÉTODO DE EXPOSIÇÃO AQUOSA)

Os resultados do BCF (cinético e em estado estacionário) dos ensaios de exposição aquosa também devem ser registados em relação a um teor normalizado de lípidos de 5 % da massa húmida, por peixe, a menos que seja possível argumentar que a substância em estudo não se acumula principalmente nos lípidos (por exemplo, algumas substâncias perfluoradas podem ligar-se às proteínas). É necessário converter os dados relativos à concentração nos peixes, ou o BCF, num teor de lípidos de 5 % em relação à massa húmida. Caso se utilizem os mesmos peixes para medir as concentrações da substância e o teor de lípidos em todos os pontos de amostragem, é necessário corrigir todas as concentrações individuais medidas em função do teor de lípidos desse peixe.

$$C_{f,L} = \frac{0,05}{L} \cdot C_f \quad [\text{Equação A5.29}]$$

em que

$C_{f,L}$ = concentração nos peixes normalizada em função dos lípidos (mg kg^{-1} massa húmida)

L = fração de lípidos (com base na massa húmida)

C_f = concentração da substância em estudo nos peixes (mg kg^{-1} massa húmida)

Se não se tiver procedido à análise dos lípidos em todos os peixes recolhidos para amostra, deve utilizar-se um valor médio para normalizar o BCF. Para o BCF do estado estacionário, deve utilizar-se o valor médio registado no final da fase de fixação no grupo de tratamento. Para a normalização de um BCF cinético, pode justificar-se, por vezes, uma metodologia diferente, por exemplo, caso se tenham verificado alterações significativas do teor de lípidos durante a fase de fixação ou de depuração. De qualquer modo, deve utilizar-se normalmente uma taxa de alimentação que minimize alterações significativas do teor de lípidos.

$$BCF_{KL} = \frac{0,05}{L_n} \cdot BCF_K \quad [\text{Equação A5.30}]$$

em que

BCF_{KL} = BCF cinético normalizado em função dos lípidos (L kg^{-1})

L_n = fração média de lípidos (com base na massa húmida)

BCF_K = BCF cinético (L kg^{-1})

REFERÊNCIAS

- 1) Arnot J.A. e Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343-2355.
- 2) Capítulo C.20 do presente anexo: *Ensaio sobre a reprodução da Daphnia magna*.
- 3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 309-320.
- 4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- 5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.

- 6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.
 - 7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
 - 8) OCDE (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
 - 9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. *T. Am. Fish. Soc.* 104: 785-792.
 - 10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al.*, Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.
 - 11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. *Can. J. Chem. Eng.* 55: 614-622.
 - 12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
 - 13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere.* 9: 3-19.
-

Apêndice 6

SECÇÃO DE EQUAÇÕES PARA O ENSAIO DE EXPOSIÇÃO AQUOSA: ENSAIO DE CONCEÇÃO MINIMIZADA

A fundamentação subjacente a esta metodologia é que o fator de bioconcentração num ensaio completo pode ser determinado como fator de bioconcentração do estado estacionário (BCF_{ss}), através do cálculo do rácio entre a concentração da substância em estudo nos tecidos dos peixes e a concentração da substância em estudo na água, ou mediante o cálculo do fator de bioconcentração cinético (BCF_k) como rácio entre a constante de velocidade de fixação k_1 e a constante de velocidade de depuração k_2 . O BCF_k é válido mesmo que não se alcance a concentração da substância no estado estacionário durante a fixação, desde que esta última e a depuração sigam aproximadamente processos de cinética de primeira ordem.

Caso se efetue uma medição da concentração da substância nos tecidos (C_{f1}) no momento em que a exposição termina (t_1) e a concentração nos tecidos (C_{f2}) for novamente medida após algum tempo (t_2), é possível estimar a constante de velocidade de depuração (k_2) por recurso à equação A5.22 do apêndice 5.

A constante de velocidade de fixação, k_1 , pode ser então determinada algebricamente através da equação A5.23 do apêndice 5 (em que C_f é igual a C_{f1} e t é igual a t_1) (1). O fator de bioconcentração cinético para a conceção minimizada (denominado BCF_{km} para o distinguir dos fatores de bioconcentração cinéticos determinados através de outros métodos) é o seguinte:

$$BCF_{km} = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{[Equação A6.1]}$$

As concentrações ou os resultados devem ser corrigidos em função da diluição de crescimento e normalizados em função de um teor de lípidos dos peixes de 5 %, como descrito no apêndice 5.

O BCF_{ss} minimizado é o BCF calculado no final da fase de fixação, pressupondo que se atingiu o estado estacionário. Apenas se pode pressupor o que precede porque o número de pontos de amostragem não é suficiente para o provar.

$$BCF_{ss} \text{ minimizado} = \frac{C_{f-minSS}}{C_{w-minSS}} \quad \text{[Equação A6.2]}$$

Em que

$C_{f-minSS}$ = Concentração nos peixes no estado estacionário pressuposto no final da fase de fixação (mg kg^{-1} massa húmida).

$C_{w-minSS}$ = Concentração na água no estado estacionário pressuposto no final da fase de fixação (mg kg^{-1}).

REFERÊNCIAS

- 1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. e Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.

Apêndice 7

SECÇÃO DE EQUAÇÕES PARA O ENSAIO DE EXPOSIÇÃO POR VIA ALIMENTAR

1. Exemplo de quantidades de constituintes de um alimento comercial para peixes
2. Exemplos de técnicas de enriquecimento do alimento
3. Cálculo da eficiência de assimilação e do fator de bioamplificação
4. Correção em função dos lípidos
5. Avaliação das diferenças entre a concentração medida no instante zero ($C_{0,m}$) e a *concentração* obtida no instante zero ($C_{0,d}$)
6. Orientações para substâncias em estudo com depuração muito rápida

1. EXEMPLO DE QUANTIDADES DE CONSTITUINTES DE UM ALIMENTO COMERCIAL PARA PEIXES

Principal constituinte	farinha de peixe
Proteína bruta	$\leq 55,0 \%$
Matéria gorda bruta	$\leq 15,0 \%$ ⁽¹⁾
Fibra bruta	$\geq 2,0 \%$
Humidade	$\geq 12 \%$
Cinzas	$\geq 8 \%$

⁽¹⁾ Em algumas regiões, pode ser possível obter apenas alimento para peixe com uma concentração de lípidos muito inferior a este limite superior. Nesses casos, os estudos devem ser executados com a concentração de lípidos inferior nos alimentos conforme fornecidos e a taxa de alimentação ajustada em conformidade para manter a saúde dos peixes. Não se deve aumentar os lípidos nos alimentos de forma artificial através da adição de óleo em excesso.

2. EXEMPLOS DE TÉCNICAS DE ENRIQUECIMENTO DO ALIMENTO

Generalidades

As dietas de controlo devem ser preparadas exatamente da mesma forma que a dieta enriquecida, mas com a ausência da substância em estudo.

Para verificar a concentração da dieta tratada, devem recolher-se, por um método adequado, amostras em triplicado do alimento enriquecido e determinar-se a concentração da substância em estudo ou a radioatividade nos extratos. Deve demonstrar-se a ocorrência de recuperações analíticas elevadas ($> 85 \%$) com variação reduzida entre amostras (as três concentrações das amostras da substância recolhidas no início do ensaio não devem variar mais de $\pm 15 \%$ da média).

Durante o ensaio por via alimentar, devem recolher-se três amostras da dieta para análise no dia 0 e no final da fase de fixação, para determinar o teor da substância em estudo na dieta.

Preparação do alimento para peixes com um material de ensaio líquido (puro)

Deve definir-se uma concentração de ensaio nominal pretendida no alimento para peixes tratado, por exemplo, 500 µg de substância em estudo/g alimento. Num frasco de vidro ou numa ampola de um evaporador rotativo, adiciona-se a quantidade adequada (em termos de massa molar ou radioatividade específica) da substância em ensaio pura a uma massa conhecida de alimento para peixes. A massa de alimento para peixes deve ser suficiente para a duração da fase de fixação (atendendo à necessidade de utilizar quantidades crescentes em cada administração de alimentos, devido ao crescimento dos peixes). O alimento para peixes/a substância em estudo devem ser misturados de um dia para o outro por rotação lenta em tambor (p. ex., com um rotor giratório ou por rotação — caso se utilize a ampola de um evaporador rotativo). A alimentação enriquecida deve ser armazenada em condições (por exemplo, de refrigeração) que mantenham a estabilidade da substância em estudo até à utilização dos alimentos.

Preparação do alimento para peixes com um excipiente de óleo de peixe ou de milho

As substâncias em estudo sólidas devem ser moídas num almofariz até que se obtenha um pó fino. As substâncias em estudo líquidas podem ser diretamente adicionadas ao óleo de peixe ou de milho. A substância em estudo deve ser dissolvida numa quantidade conhecida de óleo de peixe ou de milho (por exemplo, 5-15 ml). O óleo com a substância é transferido quantitativamente para uma ampola de um evaporador rotativo de dimensão adequada. O frasco utilizado para preparar o óleo com a substância deve ser lavado com duas pequenas alíquotas de óleo que serão acrescentadas à ampola para garantir a transferência de toda a substância em estudo. Para garantir a dissolução/dispersão completa no óleo (ou caso se utilize mais do que uma substância em estudo no ensaio), introduz-se um microagitador, o frasco é tapado e a mistura é vigorosamente agitada de um dia para o outro. Para o ensaio, coloca-se uma quantidade adequada de alimento dos peixes (normalmente sob a forma de granulados) na ampola, sendo o conteúdo desta agitado de modo homogêneo por rotação contínua durante, pelo menos, 30 minutos, mas de preferência de um dia para o outro. A partir daí, o alimento enriquecido é armazenado de modo adequado (p.ex., com refrigeração) para garantir a estabilidade da substância em estudo no alimento até à utilização deste.

Preparação do alimento para peixes com um solvente orgânico

Dissolve-se uma quantidade adequada (em termos de massa molar ou radioatividade específica) da substância em estudo, suficiente para atingir a dose pretendida, num solvente orgânico adequado (p. ex., 10-40 ml de ciclo-hexano ou acetona, ou um volume mais elevado se necessário, em função da quantidade de alimentos a enriquecer). Deve misturar-se quer uma alíquota desta solução quer a totalidade da mesma (no que se refere à porção adicionada) com a massa de alimento para peixes adequada suficiente para que o ensaio atinja o nível de dosagem nominal exigido. O alimento/a substância em estudo podem ser misturados num recipiente de mistura de aço inoxidável; o alimento recentemente enriquecido deve permanecer no recipiente, numa hote, durante dois dias, sendo ocasionalmente agitado, para permitir que o excesso de solvente evapore, ou colocado na ampola de um evaporador rotativo com rotação contínua. O excesso de solvente pode ser removido com um fluxo de ar ou azoto, se necessário. Há que garantir que a substância em estudo não cristaliza à medida que o solvente é removido. A alimentação enriquecida deve ser armazenada em condições (p. ex., com refrigeração) que mantenham a estabilidade da substância em estudo até à utilização dos alimentos.

3. CÁLCULO DA EFICIÊNCIA DE ASSIMILAÇÃO E DO FATOR DE BIOAMPLIFICAÇÃO

Para calcular a eficiência de assimilação, deve estimar-se, em primeiro lugar, a constante de velocidade de depuração de acordo com a secção 4 do apêndice 5 (através do «método sequencial», ou seja, regressão linear normalizada) com concentrações médias das amostras da fase de depuração. A constante de velocidade de alimentação, I , e a duração da fixação, t , são parâmetros conhecidos do estudo. O parâmetro C_{alimento} — concentração média da substância em estudo no alimento — é uma variável determinada no ensaio. $C_{0,d}$, a concentração da substância em estudo nos peixes no final da fase de fixação, é normalmente obtida a partir da ordenada na origem de uma representação gráfica do logaritmo natural da concentração em função do dia de depuração.

A eficiência de assimilação da substância (a , absorção da substância em estudo no intestino) é calculada do seguinte modo:

$$a = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{\text{alimento}}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{Equação A7.1}]$$

em que:

$C_{0,d}$ = concentração obtida nos peixes no instante zero da fase de depuração (mg kg^{-1});

k_2 = constante de velocidade de depuração global (não corrigida em função do crescimento) (dia^{-1}), calculada segundo as equações apresentadas no apêndice 5, secção 3;

I = constante de velocidade de ingestão do alimento (g alimento g^{-1} peixes dia^{-1});

C_{alimento} = concentração nos alimentos (mg kg^{-1} alimento);

t = duração do período de alimentação (dia)

Pode ser, contudo, necessário ajustar a taxa de alimentação, I , utilizada no cálculo em função do crescimento dos peixes, para obter uma eficiência de assimilação correta, a . Num ensaio em que os peixes cresçam significativamente durante a fase de fixação (na qual não é efetuada qualquer correção das quantidades de alimentação para manter a taxa de alimentação definida), a taxa de alimentação real à medida que a fixação progride será inferior à definida, o que resulta numa eficiência de assimilação «real» mais elevada. Importa salientar que o que precede não é importante para o cálculo global do BMF, já que as condições de I são efetivamente anuladas entre a equação A7.1 e a equação A7.4. É possível obter a taxa média de alimentação corrigida em função da diluição de crescimento, I_g , de várias formas, mas um método simples e rigoroso consiste na utilização da constante de velocidade de crescimento conhecida (k_g) para estimar o peso dos peixes de ensaio em determinados pontos durante a fase de fixação, ou seja:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g t} \quad [\text{Equação A7.2}]$$

em que

$W_f(t)$ = peso médio dos peixes no dia de fixação t

$W_{f,0}$ = peso médio dos peixes no início da experiência

Deste modo, é (pelo menos) possível estimar o peso médio dos peixes no último dia de exposição ($W_{f,\text{final da fixação}}$). Uma vez que a taxa de alimentação foi definida com base em $W_{f,0}$, é possível calcular a taxa de alimentação real para cada dia de fixação através destes dois valores relativos ao peso. A taxa de alimentação corrigida em função do crescimento, I_g (g alimento g^{-1} peixes dia^{-1}), a utilizar em vez de I em casos de crescimento rápido durante a fase de fixação, pode ser calculada como

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{\text{final da absorção}}} \quad [\text{Equação A7.3}]$$

Após a obtenção da eficiência de alimentação, é possível calcular o BMF multiplicando-a pela constante de velocidade de alimentação I (ou I_g , se utilizado para calcular a) e dividindo o produto pela constante de velocidade de depuração global k_2 :

$$\text{BMF} = \frac{I \times a}{k_2} \quad [\text{Equação A7.4}]$$

O fator de bioamplificação corrigido em função do crescimento deve ser calculado da mesma forma, com a constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento (obtida em conformidade com a secção 7 do apêndice 5). Novamente, se I_g tiver sido utilizado para calcular a , também deve ser utilizado neste caso em vez de I :

$$\text{BMF} = \frac{I \times a}{k_{2g}} \quad [\text{Equação A7.5}]$$

em que:

α = eficiência de assimilação (absorção da substância em estudo no intestino);

k_2 = constante de velocidade de depuração global (não corrigida em função do crescimento) (dia^{-1}), calculada segundo as equações apresentadas no apêndice 5, secção 3;

k_{2g} = constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento (dia^{-1});

I = constante de velocidade de ingestão do alimento (g alimento g^{-1} peixes dia^{-1});

A semivida corrigida em função do crescimento ($t_{1/2}$) é calculada da seguinte forma.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{2g}} \quad [\text{Equação A7.6}]$$

A eficiência de assimilação da substância a partir da alimentação também pode ser estimada se se determinarem os resíduos nos tecidos durante a fase linear da fase de fixação (entre os dias 1 e 3). Neste caso, é possível determinar a eficiência de assimilação da substância (α) do seguinte modo

$$\alpha = \frac{C_{\text{peixes}}(t)}{I \times C_{\text{alimento}} \times t} \quad [\text{Equação A7.7}]$$

Em que,

$C_{\text{peixes}}(t)$ = a concentração da substância em estudo nos peixes no tempo t (mg kg^{-1} massa húmida).

4. CORREÇÃO EM FUNÇÃO DOS LÍPIDOS

Caso se tenha determinado o teor de lípidos nos mesmos peixes que foram submetidos a análise para a determinação da substância em todos os intervalos de amostragem, as concentrações individuais devem ser corrigidas em função dos lípidos e o logaritmo natural da concentração corrigido em função dos lípidos deve ser representado graficamente em função da depuração (dia) para apresentar $C_{0,d}$ e k_2 . Subsequentemente, é possível calcular a eficiência de assimilação (equação A7.1) em função dos lípidos, através de C_{alimento} em função dos lípidos (isto é, C_{alimento} é multiplicado pela fração média de lípidos do alimento). O cálculo subsequente com a equação A7.4 e a equação A7.5 dará diretamente o BMF corrigido em função dos lípidos (e corrigido em função da diluição de crescimento).

Caso contrário, a fração média de lípidos (p/p) nos peixes e nos alimentos é obtida para os grupos de tratamento e de controlo (para os alimentos e os peixes do grupo de controlo isto é normalmente efetuado a partir dos dados determinados no início e no final da exposição; no que se refere aos peixes do grupo de tratamento, isto é normalmente realizado a partir dos dados determinados apenas no final da exposição). Em alguns estudos, o teor de lípidos dos peixes pode aumentar significativamente; nesses casos, é mais adequado utilizar uma concentração média de lípidos nos peixes do lote de ensaio calculada a partir dos valores medidos no final da exposição e no final da depuração. Em geral, devem utilizar-se apenas os dados do grupo de tratamento para obter ambas as frações de lípidos.

O fator de correção em função dos lípidos (L_c) é calculado da seguinte forma:

$$L_c = \frac{L_{\text{peixes}}}{L_{\text{alimento}}} \quad [\text{Equação A7.8}]$$

Em que L_{peixes} e L_{alimento} são as frações médias de lípidos nos peixes e no alimento, respetivamente.

O fator de correção em função dos lípidos é utilizado para calcular o fator de bioamplificação corrigido em função dos lípidos (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_c} \quad \text{[Equação A7.9]}$$

5. AVALIAÇÃO DAS DIFERENÇAS ENTRE A CONCENTRAÇÃO MEDIDA NO INSTANTE ZERO ($C_{0,m}$) E A CONCENTRAÇÃO OBTIDA NO INSTANTE ZERO ($C_{0,d}$)

A concentração medida no instante zero ($C_{0,m}$) e a concentração obtida no instante zero ($C_{0,d}$) devem ser comparadas. Caso sejam muito semelhantes, tal apoia o modelo de primeira ordem utilizado para obter os parâmetros de depuração.

Em alguns estudos, pode observar-se uma diferença acentuada entre o valor obtido no instante zero $C_{0,d}$, e a concentração média medida no instante zero, $C_{0,m}$ (ver último ponto do ponto 159 do presente método de ensaio). Se $C_{0,d}$ for muito inferior a $C_{0,m}$ ($C_{0,d} \ll C_{0,m}$), a diferença pode sugerir a presença de alimento enriquecido não digerido nos intestinos. Isto pode ser verificado experimentalmente mediante uma análise separada do intestino excisado, caso tenham sido recolhidas e armazenadas no final da fase de fixação amostras adicionais (peixes inteiros). Caso contrário, se um teste estatisticamente válido aos valores anómalos aplicado à regressão linear da fase de depuração indicar que o primeiro ponto de amostragem da depuração é erradamente elevado, pode ser adequado executar a regressão linear para obter k_2 omitindo o primeiro ponto de concentração da depuração. Nestes casos, se a incerteza na regressão linear diminuir de forma acentuada, e for evidente que se registou uma cinética aproximadamente de primeira ordem, pode ser adequado utilizar os valores $C_{0,d}$ e k_2 resultantes no cálculo da eficiência de assimilação. O que precede deve ser devidamente fundamentado no relatório. É igualmente possível que não se seguisse uma cinética de primeira ordem na fase de depuração. Caso isto seja provável (*ou seja*, o logaritmo natural dos dados parece seguir uma curva em comparação com a representação gráfica da regressão linear em linha reta), é pouco provável que os cálculos de k_2 e $C_{0,d}$ sejam válidos e deve solicitar-se a orientação de um perito em bioestatística.

Se $C_{0,d}$ for muito superior ao valor medido ($C_{0,d} \gg C_{0,m}$), isto pode indicar o seguinte: que a substância foi depurada com grande rapidez (*ou seja*, os pontos de amostragem aproximaram-se do limite de quantificação do método analítico muito cedo na fase de depuração, cf. secção 6 infra); que se verificou um desvio da cinética de primeira ordem; que a regressão linear para obter k_2 e $C_{0,d}$ está errada; ou que ocorreu um problema com as concentrações medidas no estudo em alguns pontos de amostragem. Nesses casos, deve analisar-se a representação gráfica da regressão linear para verificar a ocorrência de amostras no limite de quantificação ou perto deste, valores anómalos e uma curvatura óbvia (que sugere que não se seguiu uma cinética de primeira ordem), e esses aspetos salientados no relatório. Qualquer reavaliação subsequente da regressão linear para melhorar os valores estimados deve ser descrita e fundamentada. Caso se observe um desvio acentuado da cinética de primeira ordem, é pouco provável que os cálculos de k_2 e $C_{0,d}$ sejam válidos e deve solicitar-se a orientação de um perito em bioestatística.

6. ORIENTAÇÕES PARA SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO COM DEPURAÇÃO MUITO RÁPIDA

Tal como discutido no ponto 129 do método de ensaio, algumas substâncias pode depurar com uma rapidez tal que não é possível obter uma concentração fiável no instante zero, $C_{0,d}$, e k_2 porque num momento muito precoce da fase de depuração (*isto é*, a partir da segunda amostra de depuração) deixa de ser possível medir efetivamente a substância nas amostras (concentrações registadas no limite de quantificação). Esta situação foi observada no ensaio interlaboratorial levado a cabo para fundamentar este método de ensaio com benzo[a]pireno e documentada no relatório de validação do método. Nestes casos não é possível realizar uma regressão linear com fiabilidade, sendo que esta é suscetível de dar uma estimativa elevada pouco realista de $C_{0,d}$, o que resulta numa eficiência de assimilação aparente muito superior a 1. Nestes casos, é possível calcular uma estimativa prudente de k_2 e um «limite superior» do BMF.

Utilizando os valores da fase de depuração nos quais se mediu uma concentração, até e incluindo a primeira concentração «não detetável» (concentração no limite de quantificação), uma regressão linear (utilizando o logaritmo natural da concentração em função do tempo) dará uma estimativa de k_2 . Para estes tipos de casos, é provável que tal implique apenas dois valores (por exemplo, dias 1 e 2 de depuração) e subsequentemente é possível estimar o valor k_2 através da equação A5.22 no apêndice 5. Esta estimativa de k_2 pode ser utilizada para estimar uma eficiência de assimilação de acordo com a equação A7.1, substituindo o valor $C_{0,d}$ na equação pela concentração medida no instante zero ($C_{0,m}$) nos casos em que se estime claramente que $C_{0,d}$ é muito superior ao que teria sido possível atingir no ensaio. Caso $C_{0,m}$ não seja determinável, deve utilizar-se o limite de deteção nos tecidos dos peixes. Se, em alguns casos, se obtiver um valor de $\alpha > 1$, como «cenário pessimista» pressupõe-se que a eficiência de assimilação é 1.

Subsequentemente, é possível estimar o BMF_k máximo com a equação A7.4, e deve ser identificado como um valor «muito inferior a» ($<<$). Por exemplo, no que diz respeito a um estudo levado a cabo com uma taxa de alimentação de 3 %, uma semivida de depuração inferior a 3 dias, e um «cenário pessimista» para α de 1, é provável que o BMF_k seja inferior em cerca de 0,13. Tomando em consideração o objetivo desta estimativa e o facto de que os valores serão de carácter prudente, não é necessário corrigi-los em função da diluição de crescimento nem do teor de lípidos nos peixes e no alimento.

Apêndice 8

METODOLOGIAS PARA ESTIMAR BCF PROVISÓRIOS A PARTIR DOS DADOS RECOLHIDOS NO ESTUDO DE EXPOSIÇÃO POR VIA ALIMENTAR

O método por via alimentar é incluído no presente método de ensaio para o ensaio da bioacumulação de substâncias que não podem, na prática, ser ensaiadas através do método de exposição aquosa. O método de exposição aquosa apresenta um fator de bioconcentração, ao passo que o método por via alimentar conduz diretamente a informações sobre o potencial de bioamplificação da alimentação. Em muitos regimes de segurança química são exigidas informações sobre a bioconcentração aquática (por exemplo, na avaliação dos riscos e no Sistema Mundial Harmonizado de Classificação). Portanto, é necessário utilizar os dados gerados no estudo alimentar para estimar um fator de bioconcentração comparável aos ensaios realizados de acordo com o método de exposição aquosa ⁽¹⁾. A presente secção explora metodologias que podem ser seguidas para este efeito, reconhecendo, no entanto, as deficiências inerentes às estimativas.

O estudo alimentar mede a depuração para dar uma constante de velocidade de depuração, k_2 . Caso seja possível estimar uma constante de velocidade de fixação com os dados disponíveis para a situação na qual os peixes foram expostos à substância em estudo através da água, é possível estimar um BCF cinético.

A estimativa de uma constante de velocidade de depuração para a exposição de uma substância em estudo na água depende de muitos pressupostos, todos os quais contribuirão para a incerteza da estimativa. Além disso, esta metodologia para estimar um BCF pressupõe que a velocidade global de depuração (incluindo fatores contribuintes como a distribuição no corpo e os processos de depuração individuais) é independente da técnica de exposição utilizada para produzir uma carga corporal da substância em estudo.

Os principais pressupostos inerentes à metodologia de estimativa podem ser resumidos do modo apresentado infra.

A depuração no seguimento da fixação por via alimentar é idêntica à depuração na sequência da exposição no que se refere a uma determinada substância

A fixação a partir da água deve seguir uma cinética de primeira ordem

Consoante o método utilizado para estimar a fixação:

- A fixação pode ser correlacionada apenas com o peso dos peixes;
- A fixação pode ser correlacionada apenas com o coeficiente de partição octanol-água da substância;
- A fixação pode ser correlacionada com uma combinação do peso dos peixes e do coeficiente de partição octanol-água da substância;
- Os fatores passíveis de afetar a fixação num estudo de exposição aquosa na prática, como a biodisponibilidade da substância, a adsorção para o equipamento, o tamanho molecular, etc., têm pouco efeito;
- e, fundamentalmente:

A base de dados («série de rastreio») utilizada para desenvolver o método de estimativa da fixação é representativa da substância em apreço.

Várias publicações na literatura aberta obtiveram equações que relacionam a fixação a partir da água nos peixes através das guelras com o coeficiente de partição octanol-água de uma substância, o peso dos peixes (1) (2) (3) (4), o volume e/ou teor de lípidos, a permeação/difusão por membrana (5) (6), o volume de ventilação dos peixes (7) e através de uma metodologia de fugacidade/balanço de massas (8) (9) (10). Crookes & Brooke (11) apresentam, neste âmbito, uma avaliação pormenorizada destes métodos. Uma publicação de Barber (12) incidiu sobre a modelação da bioacumulação através da fixação por via alimentar, o que também é útil neste contexto, uma vez que inclui contributos de modelos de velocidade de fixação através das guelras. Uma secção do documento de base do protocolo alimentar de 2004 (13) também se dedicou a este aspeto.

⁽¹⁾ Na natureza, a via que conduz à exposição mais elevada nos ambientes aquosos é provavelmente a ingestão no que diz respeito à substâncias muito hidrófobas e, como tal, um BCF estimado não é estritamente representativo do potencial de bioacumulação de uma substância deste tipo.

A maioria destes modelos parece ter sido obtida com bases de dados limitadas. No que se refere aos modelos nos quais as informações da base de dados utilizada para desenvolver o modelo se encontram disponíveis, afigura-se que os tipos de substâncias utilizados são muitas vezes de estrutura ou classe semelhantes (em termos de funcionalidade, por exemplo, organoclorados). Isto aumenta a incerteza na utilização de um modelo para prever uma constante de velocidade de fixação para um tipo de substância diferente, para além de considerações específicas do ensaio, como a espécie, a temperatura, etc.

Uma revisão das técnicas disponíveis (11) sublinhou que não existe um método «mais correto» do que os restantes. Portanto, deve apresentar-se uma fundamentação clara para o modelo utilizado. Sempre que se encontrem disponíveis vários métodos cuja utilização seja justificável, pode ser prudente apresentar várias estimativas de k_1 (e também do BCF) ou um intervalo de valores k_1 (e do BCF) de acordo com vários métodos de estimativa da fixação. Contudo, tomando em consideração as diferenças nos tipos de modelos e conjuntos de dados utilizados para o seu desenvolvimento, não seria adequado adotar um valor médio das estimativas obtidas de várias formas.

Alguns investigadores postularam que este tipo de estimativas do BCF exige uma correção em função da biodisponibilidade para tomar em consideração a adsorção de uma substância para o carbono orgânico dissolvido (COD) em condições de exposição aquosa, de modo a que a estimativa esteja em conformidade com os resultados dos estudos de exposição aquosa (por exemplo, (13) (14)). Contudo, esta correção pode não ser adequada devido aos níveis reduzidos de COD necessários num estudo de exposição aquosa para uma estimativa de um cenário pessimista (*ou seja*, rácio entre a substância biodisponível e a substância determinada na solução). No respeitante às substâncias muito hidrófobas, a fixação nas guelras pode ser limitada pela taxa de difusão passiva perto da superfície das guelras; neste caso, é possível que a correção tome este efeito em consideração ao invés do efeito para o qual foi concebida.

É aconselhável incidir em métodos que exijam informações para as quais existem dados imediatamente disponíveis no que se refere às substâncias ensaiadas de acordo com o estudo alimentar aqui descrito (*ou seja*, $\log K_{OW}$, peso dos peixes). É possível aplicar outros métodos que exijam informações mais complexas, mas estes podem necessitar de medições adicionais no ensaio ou conhecimentos pormenorizados sobre a substância em estudo ou espécies de peixes que podem não estar amplamente disponíveis. Além disso, a seleção do modelo pode ser influenciada pelo nível de validação e o domínio de aplicabilidade (ver (11) para uma revisão e comparação de diferentes métodos).

Importa tomar em consideração que a estimativa de k_1 resultante e o BCF estimado são incertos e pode ser necessário tratá-los numa abordagem de suficiência de prova em conjunto com o BMF obtido e os parâmetros da substância (por exemplo, tamanho molecular) para obter um quadro global do potencial de bioacumulação de uma substância. A interpretação e utilização destes parâmetros podem depender do quadro regulamentar.

REFERÊNCIAS

- 1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 25: 1-14.
- 2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. *Aquat. Toxicol.* 30: 325-341.
- 3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- 4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1963-1992.
- 5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in *Aquatic Toxicology and Environmental Fate*, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

- 6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343-2355.
- 7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
- 8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1399-1420.
- 9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environ. Sci. Technol.* 31: 577-583.
- 10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. *QSAR Comb. Sci.* 22: 337-345.
- 11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.
- 12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 755-777
- 13) Anónimo (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- 14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in *Handbook of property estimation methods for chemicals*, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA: 189-231.»

17) Na parte C, o capítulo C.20 é substituído pelo seguinte texto:

«C.20 Ensaio de reprodução com *Daphnia magna*

INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 211 (2012) da OCDE. As diretrizes de ensaio da OCDE são revistas periodicamente à luz dos progressos científicos. A diretriz do ensaio 211 sobre a reprodução provém do *Test Guideline* 202, parte II — ensaio de reprodução com *Daphnia* sp. (1984). Verificou-se consenso sobre a variabilidade dos dados provenientes de ensaios realizados de acordo com o método TG 202. Este facto levou a esforços consideráveis para identificar os motivos dessa variabilidade, com o objetivo de produzir um método de ensaio mais adequado. O *Test Guideline* 211 baseia-se no resultado destas atividades de investigação, ensaios interlaboratoriais e estudos de validação, realizados em 1992 (1), 1994 (2) e 2008 (3).

As principais diferenças entre a versão inicial (TG 202, de 1984) e a segunda versão (TG 211, de 1998) da diretriz de ensaio sobre a reprodução são as seguintes:

- A espécie cuja utilização se recomenda é a *Daphnia magna*;
- A duração do ensaio é de 21 dias;
- No caso dos ensaios semiestáticos, o número de animais a utilizar para cada concentração de ensaio foi diminuído de, pelo menos, 40 — de preferência divididos em quatro grupos de 10 animais — para, pelo menos, 10 animais alojados individualmente (embora se possam utilizar diferentes conceções ou modelos para os ensaios dinâmicos);

- Adotaram-se recomendações mais específicas no respeitante ao meio de ensaio e às condições de alimentação.
- As principais diferenças entre a segunda versão da diretriz de ensaio sobre a reprodução (TG 211, de 1998) e a presente versão são as seguintes:
- Foi aditado o apêndice 7, no qual se descrevem os procedimentos para a identificação do sexo dos neonatos, se necessário. Tal como nas versões anteriores do presente método de ensaio, o rácio entre os sexos é um parâmetro facultativo;
- A variável de resposta «número de descendentes vivos produzidos por animal progenitor sobrevivente» foi complementada por uma variável «reprodução da *Daphnia*» ou seja, o número total de descendentes vivos produzidos no final do ensaio por cada progenitor *Daphnia* no início do ensaio, excluindo da análise a mortalidade dos progenitores por via accidental e/ou por inadvertência. O objetivo desta variável de resposta complementar consiste em harmonizá-la com outros métodos de ensaio de reprodução com invertebrados. Além disso, esta variável permite, no que respeita ao presente método de ensaio, eliminar uma fonte de erro, a saber, o efeito da mortalidade parental involuntária e/ou accidental, caso esta ocorra no período de exposição.
- Foram incluídas diretrizes adicionais em matéria de estatística para o planeamento dos ensaios e o tratamento dos resultados, tanto para a abordagem EC_x (p. ex., EC_{10} ou EC_{50}) como para a abordagem NOEC/LOEC.
- É introduzido um ensaio no limite.

Definem-se no apêndice 1 alguns conceitos utilizados.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O principal objetivo do ensaio consiste em determinar o efeito de produtos químicos sobre a produção de descendência de *Daphnia magna*. Para tal, expõem-se fêmeas jovens *Daphnia* (animais progenitores), com menos de 24 horas de vida no início do ensaio, ao produto químico em estudo misturado na água, em diversas concentrações. A duração do ensaio é de 21 dias. No final do ensaio, determina-se o número total de descendentes vivos produzidos. A produção de descendência pelos animais progenitores pode expressar-se de outras formas (por exemplo, número de descendentes vivos produzidos por animal e por dia, desde o primeiro dia em que se observou a produção de descendência), mas essas formas devem ser descritas juntamente com o número total de descendentes vivos produzidos no fim do ensaio. Dada a conceção específica do ensaio semiestático, comparativamente com outros métodos de ensaio de reprodução com invertebrados, é também possível contar o número de descendentes vivos produzidos por cada animal progenitor. Deste modo, contrariamente a outros métodos de ensaio de reprodução com invertebrados, se o animal morrer accidental e/ou inadvertidamente durante o período de ensaio, a sua progenitura pode ser excluída da avaliação dos dados. Por conseguinte, em caso de mortalidade dos progenitores nos replicados expostos, importa ponderar se a mortalidade segue um padrão concentração-resposta: p. ex., se se observa uma regressão significativa da resposta em função da concentração do produto químico em estudo, com gradiente positivo (para tal, pode utilizar-se um teste estatístico do tipo Cochran-Armitage). Se a mortalidade não seguir um padrão concentração-resposta, os replicados com mortalidade parental devem ser excluídos da análise do resultado do ensaio. Se a mortalidade seguir um padrão concentração-resposta, a mortalidade parental deve ser atribuída a um efeito do produto químico em estudo e os replicados não devem ser excluídos da análise. Se o animal progenitor morrer durante o ensaio (quer accidentalmente — erro de manipulação, por exemplo — quer por inadvertência, devido a um incidente inexplicável não relacionado com a substância química de ensaio) ou se for um macho, o replicado é excluído do ensaio (para mais pormenores, ver ponto 51). O efeito tóxico do produto químico em estudo exprime-se ao nível da produção de descendência pelos valores EC_x , efetuando, por regressão não-linear, um ajustamento dos dados obtidos a um modelo adequado, a fim de estimar a concentração que causaria x % de redução da produção de descendência ou, em alternativa, o valor NOEC ou LOEC (4). As concentrações de ensaio devem, preferencialmente, abranger a mais baixa das concentrações com efeitos utilizadas (p. ex., EC_{10}), o que significa que o seu valor é calculado por interpolação e não por extrapolação.

Deve também registar-se a sobrevivência dos animais progenitores e o tempo que decorreu até ao aparecimento dos primeiros juvenis. Podem ainda examinar-se outros efeitos relacionados com a substância em parâmetros como o crescimento (p. ex., comprimento) e, eventualmente, a taxa intrínseca de crescimento da população (ver ponto 44).

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

Os resultados de um ensaio de toxicidade aguda (ver capítulo C2 do presente anexo: ensaio de imobilização aguda com *Daphnia magna*) podem ser úteis para a seleção de uma gama adequada de concentrações nos ensaios de reprodução. Importa conhecer a solubilidade em água e a pressão de vapor do produto químico em estudo, devendo existir um método analítico fiável para a quantificação do produto químico nas soluções de ensaio, relativamente ao qual estejam descritos a eficiência de recuperação e o limite de determinação.

A fórmula estrutural, o grau de pureza do produto químico em estudo, a estabilidade à luz, a estabilidade nas condições do ensaio, o pKa, o P_{ow} e os resultados do ensaio de biodegradabilidade direta constituem informações relativas ao produto químico em estudo que podem ser úteis para o estabelecimento das condições do ensaio — ver capítulos C.4 (determinação da biodegradabilidade direta) e C.29 (biodegradabilidade direta — CO₂ em frascos selados) do presente anexo.

VALIDADE DO ENSAIO

Para que um ensaio seja válido, devem ser satisfeitos os seguintes critérios relativamente ao(s) controlo(s):

- a mortalidade dos animais progenitores (fêmeas de *Daphnia*) no fim do ensaio não deve exceder 20 %;
- o número médio da descendência viva, produzida por animal progenitor sobrevivente no fim do ensaio, deve ser ≥ 60 .

Nota: Pode utilizar-se o mesmo critério de validade (20 %) para a mortalidade parental accidental ou por inadvertência, tanto para os controlos como para cada uma das concentrações de ensaio.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Material e aparelhagem

Os recipientes de ensaio e outros aparelhos que entrem em contacto com as soluções de ensaio devem ser, exclusivamente, de vidro ou outro material quimicamente inerte. Tratar-se-á, normalmente, de copos de vidro.

Por outro lado, será necessário utilizar parte ou a totalidade do seguinte equipamento:

- medidor de oxigénio (com microelétrodo ou outro equipamento adequado para a medição de oxigénio dissolvido em amostras com volume reduzido);
- aparelho adequado para o controlo da temperatura;
- medidor de pH;
- equipamento para a determinação da dureza da água;
- equipamento para a determinação da concentração de carbono orgânico total (COT) da água ou equipamento para a determinação da carência química de oxigénio (CQO);
- aparelho adequado para o controlo do regime de luz e a medição da intensidade da luz.

Organismo utilizado no ensaio

A espécie a utilizar no ensaio é *Daphnia magna* Straus ⁽¹⁾.

É desejável que os clones tenham sido identificados, por genotipagem. A investigação já efetuada nesse domínio (1) demonstrou que a reprodução do clone A (proveniente do 1RCHA, em França) (5) obedece de modo sistemático ao critério de validade de uma média ≥ 60 descendentes vivos por animal progenitor sobrevivente, quando cultivado nas condições descritas no presente método de ensaio. No entanto, são aceitáveis outros clones, desde que se demonstre que a cultura de *Daphnia* satisfaz os critérios de validade para o ensaio.

⁽¹⁾ Podem utilizar-se outros dafniídeos, desde que satisfaçam os critérios de validade (o critério de validade relativo à produção de descendência nos controlos deve ser aplicável a todas as espécies). Outros dafniídeos que se utilizem devem ser claramente identificados, com justificação do seu uso.

No início do ensaio, os animais devem ter menos de 24 horas de vida e não fazer parte da primeira geração produzida pelo progenitor. Devem provir de uma população saudável, isto é, não evidenciar sinais de distúrbios, tais como elevada mortalidade, presença de machos e ovos de resistência (*ephippia*), atraso na primeira postura, alterações na cor, etc. O lote de animais deve ser mantido em condições de cultura (luz, temperatura, meio, alimentação e número de animais por unidade de volume) semelhantes às que se utilizarão no ensaio. Se o meio de cultura de *Daphnia* a utilizar no ensaio for diferente do utilizado para a cultura de rotina de *Daphnia*, é boa prática incluir um período de aclimação de cerca de três semanas antes do ensaio (ou seja, uma geração) para evitar perturbações nos animais progenitores.

Meio de ensaio

Recomenda-se a utilização, neste ensaio, de um meio totalmente definido, o que permite evitar o uso de aditivos (por exemplo, algas marinhas, extrato de solo), que são difíceis de caracterizar, melhorando assim o processo de padronização entre laboratórios. Foram considerados adequados para este fim os meios Elendt M4 (6) e M7 (ver apêndice 2). São aceitáveis, porém, outros meios (ver, por exemplo, (7) e (8)), desde que as características da cultura de *Daphnia* satisfaçam os critérios de validade para o ensaio.

Se se utilizar um meio que inclua aditivos não definidos, estes terão de ser claramente especificados e o relatório do ensaio terá de incluir informações sobre a sua composição, nomeadamente no que respeita ao teor de carbono, pois este poderá contribuir para o alimento fornecido. Recomenda-se a determinação do carbono orgânico total (COT) e/ou da carência química de oxigénio (CQO) da solução de reserva do aditivo orgânico, bem como uma estimativa da contribuição resultante para os valores COT/CQO no meio de ensaio. Recomenda-se, ainda, que os níveis de COT no meio (isto é, antes da adição das algas) sejam inferiores a 2 mg/l (9).

Quando os produtos químicos contêm metais, é importante reconhecer que as propriedades do meio de ensaio (por exemplo, dureza, capacidade quelante) podem ter influência na toxicidade do produto químico de ensaio. Por esta razão, é desejável utilizar um meio cuja composição seja totalmente conhecida. Contudo, na atualidade, os únicos meios totalmente definidos que se sabe serem adequados para a cultura a longo prazo da *Daphnia magna* são os meios Elendt M4 e M7. Ambos contêm o agente quelante EDTA. Alguns estudos (2) demonstram que a «toxicidade aparente» do cádmio é geralmente menor quando o ensaio da reprodução é realizado em meios M4 e M7 do que quando é realizado num meio que não contém EDTA. Por isso, os meios M4 e M7 não são recomendados para o ensaio de produtos químicos que contenham metais, devendo igualmente ser evitados outros meios que contenham agentes quelantes. Para os produtos químicos que contenham metais, poderá ser aconselhável um meio alternativo, como, por exemplo, água dura ASTM reconstituída (9), que não contém EDTA. Esta combinação de água dura ASTM reconstituída e extrato de algas marinhas (10) é adequada para culturas de longo prazo de *Daphnia magna* (2).

A concentração de oxigénio dissolvido no início e ao longo do ensaio deve ser superior a 3 mg/l. O pH deve situar-se entre 6 e 9 e não variar mais de 1,5 unidades em nenhum ensaio. Recomenda-se uma dureza superior a 140 mg/l (expressa em CaCO₃). Ensaios a este nível e a níveis superiores demonstraram que, nessas condições, a produção de descendência cumpre os critérios de validade (11) (12).

Soluções utilizadas no ensaio

De modo geral, preparam-se as soluções de ensaio às concentrações escolhidas, por diluição de uma solução de reserva. As soluções de reserva devem ser preparadas, se possível, sem recurso a solventes ou dispersantes, por mistura ou agitação do produto químico em estudo no meio de ensaio, utilizando meios mecânicos como a agitação e a dispersão ultrassónica ou outros métodos adequados. É preferível que os sistemas de ensaio às concentrações do produto químico a utilizar no ensaio sejam expostos durante o tempo necessário para comprovar a estabilidade das concentrações de exposição antes da introdução dos organismos. Caso seja difícil dissolver em água o produto químico, procede-se como descrito no *Guidance Document* da OCDE sobre manipulação de substâncias difíceis (13). Deve evitar-se a utilização de solventes ou dispersantes, embora estes possam ser necessários em alguns casos, para obter uma solução de reserva com a concentração adequada para doseamento.

Além do ensaio das concentrações de exposição, deve realizar-se um ensaio de controlo da água de diluição com um número adequado de replicados e, se absolutamente necessário, um ensaio de controlo do solvente também com um número adequado de replicados. Apenas devem ser utilizados nestes ensaios solventes ou dispersantes que, comprovadamente, tenham influência mínima ou nula nas variáveis de resposta. A referência (13) contém exemplos de solventes (acetona, etanol, metanol, dimetilformamida, trietilenoglicol) e dispersantes (Cremofor RH 40, metilcelulose a 0,01 % e HCO-40) adequados. Caso se utilize um solvente ou dispersante, a concentração final do mesmo não pode exceder 0,1 ml/l (13) e deve ser idêntica em todos os recipientes de ensaio, exceto no grupo de controlo da água de diluição. No entanto, deve fazer-se o possível para manter a concentração do solvente a um nível mínimo.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Condições de exposição

Duração

A duração do ensaio é de 21 dias.

Taxa de carga

Os animais progenitores são mantidos individualmente, um em cada recipiente de ensaio, em geral com 50-100 ml de meio em cada recipiente (no caso da *Daphnia magna*, podem utilizar-se volumes menores, em especial para os pequenos dafnídeos, como *Ceriodaphnia dubia*), exceto se o ensaio tiver de recorrer a um regime dinâmico.

Por vezes, podem ser necessários volumes maiores, de modo a cumprir os requisitos do procedimento analítico utilizado para a determinação da concentração do produto químico em estudo, embora seja também permitida a junção de replicados para análise química. Se se utilizarem volumes superiores a 100 ml, poderá ser necessário aumentar a ração fornecida às *Daphnia* de forma a assegurar uma disponibilidade adequada de alimento e o cumprimento dos critérios de validade.

Animais de ensaio

Nos ensaios semiestáticos, devem ser mantidos individualmente, pelo menos, 10 animais em cada concentração de ensaio e 10 animais nas séries de controlo.

No caso dos ensaios por escoamento, concluiu-se ser adequado dividir 40 animais em quatro grupos de 10, para cada concentração de ensaio (1). Pode ser utilizado um número menor de organismos de ensaio, recomendando-se um mínimo de 20 animais para cada concentração, repartidos por dois ou mais replicados com igual número de animais (por exemplo, quatro replicados com cinco dafnídeos cada). Convém salientar que, nos ensaios em que os animais são mantidos em grupos, não é possível excluir nenhum descendente da análise estatística caso ocorra mortalidade accidental ou por inadvertência após o início do processo reprodutivo, pelo que, nestes casos, a descendência deve ser expressa em termos de número total de descendentes vivos produzidos por cada progenitor presente no início do ensaio.

Os tratamentos (isto é, os processos de exposição) devem ser distribuídos pelos recipientes de ensaio, e todos os processos de manuseamento subsequentes devem ser efetuados de modo aleatório. O incumprimento destas recomendações pode provocar desvios nos resultados, que poderão ser erradamente interpretados como efeitos da concentração. Em particular, se as unidades experimentais forem manuseadas por ordem de exposição ou concentração, alguns efeitos dependentes do tempo, como a fadiga do operador ou outro tipo de erro, poderão ter efeitos de maior dimensão nas concentrações mais elevadas. Além disso, se houver indicações de que os resultados do ensaio podem ser afetados por uma condição inicial ou ambiental do ensaio, como a localização no laboratório, deve considerar-se a possibilidade de efetuar o ensaio por agrupamento de recipientes.

Alimentação

Nos ensaios semiestáticos, a alimentação deve ser fornecida de preferência diariamente mas, no mínimo, três vezes por semana (isto é, correspondendo às mudanças de meio). Deve ser tida em conta a possível diluição das concentrações de exposição devido à adição dos alimentos, diluição essa que deve ser evitada tanto quanto possível, por recurso a suspensões concentradas de algas. Qualquer desvio em relação a essa norma (por exemplo, em ensaios por escoamento) deve ser indicado no relatório.

Durante o ensaio, a dieta dos animais progenitores deve consistir, de preferência, em células de algas vivas de uma ou mais das seguintes espécies: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (anteriormente *Selenastrum capricornutum*) e *Desmodesmus subspicatus* (anteriormente *Scenedesmus subspicatus*). A dieta fornecida deve basear-se na quantidade do carbono orgânico (C) fornecida a cada animal progenitor. Os dados da investigação já realizada nesta área (14) demonstram que, no caso da *Daphnia magna*, níveis de ração entre 0,1 e 0,2 mg C/*Daphnia*/dia são suficientes para atingir o número de descendentes que satisfaz o critério de validade do ensaio. A ração pode ser fornecida a taxa constante ao longo de todo o período do ensaio; se for desejável, pode utilizar-se no início uma taxa inferior, que depois se aumentará durante o ensaio em atenção ao crescimento dos animais progenitores. Neste caso, a ração deve manter-se dentro da gama recomendada de 0,1 a 0,2 mg C/*Daphnia*/dia.

Se se efetuarem medições alternativas, tais como o número de células de algas ou a absorvância, para determinar a quantidade de ração necessária (por razões de conveniência, uma vez que as medições do teor de carbono são muito mais morosas), cada laboratório deve produzir o seu próprio nomograma em que relacione a medida alternativa com o conteúdo em carbono da cultura de algas (ver apêndice 3 para conselhos sobre a elaboração do nomograma). Os nomogramas devem ser verificados, pelo menos, anualmente; e com maior frequência se tiverem sido alteradas as condições de cultura das algas. Verificou-se que a absorvância é uma medida alternativa mais adequada do que o número de células, para determinar o teor de carbono (15).

De modo a minimizar o volume do meio de cultura de algas transferido para os recipientes de ensaio, a suspensão de algas fornecida às *Daphnia* deve ser concentrada. A concentração das algas pode ser efetuada por centrifugação, seguida de ressuspensão em meio de cultura de *Daphnia*.

Luz

Período de exposição à luz: 16 horas, com uma intensidade não superior a $15\text{--}20\ \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, medida à superfície da água do recipiente. No caso dos instrumentos de medição da luz calibrados em lux, uma gama equivalente a 1 000–1 500 lux para a luz branca corresponde aproximadamente à intensidade luminosa recomendada de $15\text{--}20\ \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Temperatura

A temperatura do meio de ensaio deve situar-se entre 18 e 22 °C. No entanto, independentemente do tipo de ensaio, a temperatura não deve, se possível, variar mais de 2 °C em relação a estes limites (por exemplo, 18–20, 19–21 ou 20–22 °C) como intervalo diário. Poderá ser vantajoso utilizar um recipiente de ensaio adicional para a monitorização da temperatura.

Arejamento

Os recipientes de ensaio não devem ser arejados durante o ensaio.

Planeamento do ensaio

Ensaio de determinação de concentrações

Se necessário, realiza-se um ensaio exploratório com, por exemplo, cinco concentrações do produto químico em estudo e dois replicados, por cada exposição e controlo. Para decidir acerca das concentrações a utilizar neste ensaio exploratório, pode ser útil dispor de informações adicionais acerca da toxicidade aguda para espécies *Daphnia* e/ou outros organismos aquáticos, provenientes de ensaios de produtos químicos semelhantes ou de referências.

A duração do ensaio de determinação de concentrações é de 21 dias ou, em alternativa, um período suficiente para prever com fiabilidade a intensidade dos efeitos. No final do ensaio, avalia-se a reprodução da *Daphnia*. Deve registar-se o número de progenitores e a presença de descendentes.

Ensaio definitivo

Normalmente, devem ser testadas pelo menos cinco concentrações de ensaio — abrangendo a concentração efetiva (p. ex., EC_x) — dispostas numa série geométrica com um fator de separação que não exceda, de preferência, 3,2. Deve utilizar-se um número de replicados apropriado para cada concentração de ensaio (ver pontos 24 e 25). A eventual utilização de menos de cinco concentrações deve ser justificada. Os produtos químicos não devem ser ensaiados acima do seu limite de solubilidade no meio de ensaio. Antes de se realizar o ensaio, é desejável ponderar a representatividade estatística da sua conceção e utilizar métodos estatísticos adequados (4). Na escolha da gama de concentrações, importa ter presente o seguinte:

- i) Se se estimar a EC_x em relação aos efeitos na reprodução, é aconselhável utilizar concentrações suficientes para definir este parâmetro com um nível de confiança apropriado. As concentrações de ensaio devem, de preferência, abranger a EC_x estimada, para que esta seja determinada por interpolação e não por extrapolação. Para a análise estatística subsequente, é vantajoso dispor de mais concentrações de ensaio (p. ex., 10) e um menor número de replicados de cada concentração (p. ex., 5, mantendo, assim, constante o número total de recipientes) e 10 controlos.
- ii) Ao estimar a LOEC e/ou a NOEC, a concentração de ensaio mínima deve ser suficientemente baixa para que a fecundidade a essa concentração não seja significativamente inferior à do controlo. Se não for este o caso, o ensaio deve ser repetido, baixando a concentração de ensaio mínima.
- iii) Ao estimar a LOEC e/ou a NOEC, a concentração de ensaio máxima deve ser suficientemente elevada para que a fecundidade a essa concentração seja significativamente inferior à do controlo. Se não for este o caso, o ensaio deve ser repetido elevando a concentração de ensaio máxima, salvo se, no ensaio inicial, foi utilizada, como concentração de ensaio máxima, a concentração máxima de ensaio necessária para o ensaio dos efeitos crónicos (ou seja, 10 mg/l).

Se não se observarem efeitos com a concentração máxima (p. ex., 10 mg/l) no ensaio de determinação de concentrações ou se for muito provável que o produto químico em estudo tenha uma toxicidade baixa ou nula, com base na ausência de toxicidade em outros organismos e/ou numa absorção baixa ou nula, o ensaio da reprodução pode ser executado como ensaio no limite, utilizando uma concentração de, p. ex., 10 mg/l, além do controlo. Devem utilizar-se dez replicados, tanto para os grupos de exposição como para os grupos de controlo. Se se afigurar necessário um ensaio no limite com um sistema por escoamento, podem utilizar-se menos replicados. Um ensaio no limite representa a oportunidade para demonstrar a inexistência de efeito estatisticamente significativo na concentração-limite; contudo, se se registarem efeitos, é necessário, em geral, um ensaio completo.

Grupos de controlo

A par das séries de ensaio, deve ser realizada uma série de ensaios de controlo do meio e também, se aplicável, uma série de controlo com o solvente ou dispersante. Se se utilizarem solventes ou dispersantes, a sua concentração deve ser igual à utilizada nos recipientes com o produto químico em estudo. Deve utilizar-se um número adequado de replicados (ver pontos 23 e 24).

Em geral, num ensaio bem realizado, o coeficiente de variação relativamente ao número médio de descendentes vivos produzidos por cada animal progenitor no(s) controlo(s) deve ser $\leq 25\%$, o que deve ser incluído nos planos de ensaio que utilizem animais mantidos individualmente.

Renovação do meio de ensaio

A frequência da renovação do meio depende da estabilidade do produto químico em estudo, mas deve ser, no mínimo, de três vezes por semana. Se, com base em ensaios de estabilidade preliminares (ver ponto 7), a concentração do produto químico em estudo não for estável (isto é, se se situar fora da gama de 80-120 % do valor nominal ou abaixo de 80 % da concentração inicial medida) durante o período máximo de renovação (isto é, três dias), deve ponderar-se uma renovação mais frequente do meio ou um ensaio por escoamento.

Nos ensaios semiestáticos, quando o meio é renovado, deve preparar-se uma segunda série de recipientes de ensaio para onde se transferem os animais progenitores, utilizando, por exemplo, uma pipeta de vidro de diâmetro adequado. O volume do meio transferido com as *Daphnia* deve ser mínimo.

Exames

Os resultados das observações durante o ensaio devem ser registados em folhas de dados (ver exemplos nos apêndices 4 e 5). Se se exigirem outras medições (ver ponto 44), poderão ser necessárias observações adicionais.

Descendência

Os descendentes produzidos por cada animal progenitor devem ser retirados e contados, de preferência diariamente desde o aparecimento dos primeiros juvenis, para evitar que estes consumam o alimento destinado ao progenitor. Embora, para atingir o objetivo deste método de ensaio, seja apenas necessário contar o número de descendentes vivos, também deve ser indicada no relatório a presença de ovos abortados ou de descendentes mortos.

Mortalidade

A mortalidade entre os animais progenitores deve ser registada diariamente ou, no mínimo, sempre que se proceda à contagem dos descendentes.

Outros parâmetros

Embora o presente método de ensaio seja planeado sobretudo para avaliar os efeitos na produção de descendência, poderão também ser suficientemente quantificados outros efeitos, de modo a permitir uma análise estatística. Pode registar-se a produção de descendência por animal progenitor sobrevivente, isto é, o número de descendentes vivos produzidos durante o ensaio por cada progenitor sobrevivente. Este dado pode ser comparado com a principal variável de resposta (produção de descendência por animal progenitor presente no início do ensaio que não tenha morrido por inadvertência ou acidentalmente durante o ensaio). Em caso de mortalidade dos progenitores nos replicados expostos, importa ponderar se esta segue um padrão concentração-resposta: p. ex., se se observa uma regressão significativa da resposta em função da concentração do produto químico em estudo, com gradiente positivo (para tal, pode utilizar-se um teste estatístico do tipo Cochran-Armitage). Se a mortalidade não seguir um padrão concentração-resposta, os replicados com mortalidade parental devem ser excluídos da análise do resultado do ensaio. Se a mortalidade seguir um padrão concentração-resposta, a mortalidade parental deve ser atribuída a um efeito do produto químico em estudo e os replicados não devem ser excluídos da análise dos resultados do ensaio. São desejáveis medições do crescimento, pois fornecem informação sobre possíveis efeitos subletais, que podem ser úteis em complemento das medições simples de reprodução. Recomenda-se a medição do comprimento dos animais progenitores (isto é, o comprimento do corpo, excluindo o espinho anal) no final do ensaio. O tempo necessário para a produção da primeira geração (e das seguintes), o número e a dimensão das gerações por animal progenitor, o número de ovos abortados, a presença de machos neonatos (OCDE, 2008) ou de ovos de repouso (*ephippia*) e, eventualmente, a taxa intrínseca de crescimento da população são outros parâmetros que podem ser medidos ou calculados (ver apêndice 1, para a definição, e apêndice 7, para a identificação do sexo dos neonatos).

Frequência das medições e determinações analíticas

Pelo menos uma vez por semana, deve medir-se a concentração de oxigénio, a temperatura, o grau de dureza e os valores de pH nos meios frescos e usados, nos controlo(s) e na maior concentração do produto químico em estudo.

Durante o ensaio, determinam-se a intervalos regulares as concentrações do produto químico em estudo.

Nos ensaios semiestáticos, em que a concentração do produto químico em estudo se deve manter a $\pm 20\%$ do valor nominal (isto é, na gama 80-120 % — ver pontos 6, 7 e 39), recomenda-se que, no mínimo, sejam analisadas a maior e a menor concentrações de ensaio quando acabadas de preparar e uma vez durante a primeira semana do ensaio, na altura da renovação do meio (isto é, devem ser efetuadas análises numa amostra da solução no momento em que esta é preparada e no momento da renovação do meio). Em seguida, essas determinações devem ser repetidas, pelo menos, a intervalos semanais.

Para os ensaios em que não se espera que a concentração do produto químico em estudo se mantenha a $\pm 20\%$ do valor nominal, é necessário analisar todas as concentrações de ensaio, no momento em que são preparadas e na altura da renovação do meio. No entanto, para os ensaios em que a concentração inicial medida do produto químico em estudo não se encontra no intervalo de $\pm 20\%$ do valor nominal, mas em que é possível fornecer provas suficientes de que as concentrações iniciais são reprodutíveis e estáveis (isto é, mantêm-se na gama 80-120 % das concentrações iniciais), as determinações químicas podem ser reduzidas nas semanas segunda e terceira do ensaio, limitando-se às concentrações maior e menor. Em todos os casos, a determinação das concentrações do produto químico em estudo antes da renovação do meio só precisa de ser efetuada no recipiente de um dos replicados, para cada concentração de ensaio.

Se se efetuar um ensaio com escoamento, é adequado aplicar um método de amostragem semelhante ao descrito para os ensaios semiestáticos (não sendo, neste caso, aplicável a medição de soluções usadas). Pode, porém, ser aconselhável aumentar o número de amostragens durante a primeira semana (efetuando três conjuntos de medições, por exemplo), de modo a assegurar que as concentrações de ensaio se mantêm estáveis. Nestes tipos de ensaio, a taxa de fluxo do diluente e do produto químico em estudo deve ser verificada diariamente.

Se houver provas de que, durante o ensaio, a concentração do produto químico em estudo não excedeu $\pm 20\%$ da concentração nominal ou da concentração inicial medida, os resultados podem basear-se nos valores nominais ou iniciais medidos. Se o desvio em relação à concentração nominal ou à concentração inicial medida for superior a $\pm 20\%$, os resultados devem ser expressos em termos de média ponderada em função do tempo (ver diretrizes de cálculo no apêndice 6).

RESULTADOS E RELATÓRIO

Tratamento dos resultados

O objetivo do ensaio consiste em determinar os efeitos do produto químico em estudo na produção de descendência. Deve calcular-se o número total de descendentes vivos por animal progenitor, em cada recipiente de ensaio (isto é, em cada replicado). Por outro lado, a reprodução pode ser determinada com base na produção de descendentes vivos pelo progenitor sobrevivente. No entanto, a variável de resposta mais pertinente do ponto de vista ecológico é o número total de descendentes vivos produzidos por cada animal progenitor que não morra acidental ⁽¹⁾ ou inadvertidamente ⁽²⁾ durante o ensaio. Se o progenitor morrer acidental ou inadvertidamente durante o ensaio ou for um macho, o replicado é excluído da análise. A análise basear-se-á então num número reduzido de replicados. Em caso de mortalidade dos progenitores nos replicados expostos, importa ponderar se esta segue um padrão concentração-resposta: p. ex., se se observa uma regressão significativa da resposta em função da concentração do produto químico em estudo, com gradiente positivo (para tal, pode utilizar-se um teste estatístico do tipo Cochran-Armitage). Se a mortalidade não seguir um padrão concentração-resposta, os replicados com mortalidade parental devem ser excluídos da análise do resultado do ensaio. Se a mortalidade seguir um padrão concentração-resposta, a mortalidade parental deve ser atribuída a um efeito do produto químico em estudo e os replicados não devem ser excluídos da análise dos resultados do ensaio.

Em resumo, se se utilizarem a LOEC e a NOEC ou a EC_x para exprimir os efeitos, recomenda-se que o cálculo destes na reprodução recorra a ambas as variáveis de resposta supramencionadas, ou seja,

- o número total de descendentes vivos produzidos por cada animal progenitor que não morra acidental ou inadvertidamente durante o ensaio.
- o número de descendentes vivos produzidos por cada animal progenitor sobrevivente;

e utilizar como resultado final o valor mais baixo de LOEC e NOEC ou da EC_x , calculado com base nestas duas variáveis de resposta.

Antes de efetuar a análise estatística (p. ex., mediante procedimentos ANOVA ou a comparação entre as exposições e os controlos, por testes t-Student, de Dunnett, de Williams, ou pelo teste descendente de Jonckheere-Terpstra), é recomendável ponderar a transformação dos dados, se tal for necessário ao cumprimento dos requisitos do ensaio estatístico. Como alternativas não-paramétricas, podem utilizar-se os testes de Dunn ou de Mann-Whitney. Calculam-se os intervalos de confiança a 95 % para as médias correspondentes a cada nível de exposição.

⁽¹⁾ Mortalidade acidental: mortalidade não relacionada com o produto químico, de origem acidental (ou seja, causa conhecida)

⁽²⁾ Mortalidade por inadvertência: mortalidade não relacionada com o produto químico, com causa desconhecida

O número de progenitores sobreviventes nos grupos de controlo não expostos ao produto químico em estudo constitui um critério de validação, sendo necessário registá-lo e referi-lo no relatório. Também devem constar do relatório final quaisquer outros efeitos negativos, como comportamentos anormais e constatações toxicológicas significativas.

EC_x

Calculam-se os valores de EC_x, assim como os correspondentes limites de confiança superior e inferior, recorrendo a métodos estatísticos adequados (função logística ou de Weibull, método simplificado de Spearman-Kärber ou interpolação simples). Para calcular a EC₁₀, a EC₅₀ ou qualquer outra EC_x, procede-se a uma análise de regressão da série completa de dados.

NOEC/LOEC

Se a análise estatística tiver por objetivo determinar a NOEC/LOEC, devem utilizar-se métodos estatísticos adequados, de acordo com o documento n.º 54 da OCDE intitulado *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application* (4). Em geral, investigam-se os efeitos adversos do produto químico em estudo, comparativamente ao grupo de controlo, efetuando testes de normalidade da distribuição e a homogeneidade da variância recorrendo a um teste estatístico adequado: por exemplo, o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene, respetivamente ($p \leq 0,05$).

Podem também efetuar-se uma análise ANOVA unifatorial e os subsequentes testes de múltiplas comparações. Pode recorrer-se a múltiplas comparações (p. ex., o teste de Dunnett) ou a testes de tendência regressivos (p. ex., o teste de Williams ou o teste descendente de Jonckheere-Terpstra) para determinar se há diferenças com significância estatística ($p \leq 0,05$) entre os grupos de controlo e as diversas concentrações do produto químico em estudo — para escolher o teste recomendado, consultar o documento n.º 54 da OCDE (4). Alternativamente, pode recorrer-se a métodos não-paramétricos (por exemplo, o teste U com ajustamento de Bonferroni-Holm ou o teste de tendência de Jonckheere-Terpstra) para determinar a NOEC e a LOEC.

Ensaio no limite

Caso se tenha realizado um ensaio no limite (comparação do grupo de controlo unicamente com um nível de exposição) e estejam preenchidos os requisitos para a realização de testes paramétricos (no tocante a normalidade e a homogeneidade), pode efetuar-se uma avaliação das respostas mensuráveis recorrendo ao teste t de Student. Se estes requisitos não forem preenchidos, pode recorrer-se a um teste t de variância desigual (como o teste de Welch) ou a um teste não-paramétrico, como o teste U de Mann-Whitney.

Para verificar se há diferenças com significância entre grupos de controlo (grupo de controlo e grupo de controlo do solvente ou dispersante), pode efetuar-se um teste aos replicados de cada grupo de controlo, como se explicou para o ensaio no limite. Caso os testes realizados não detetem diferenças com significância estatística, podem agregar-se todos os replicados do grupo de controlo e do grupo de controlo do solvente. Caso contrário, é necessário comparar cada nível de exposição com o grupo de controlo do solvente.

Relatório de ensaio

O relatório do ensaio deve incluir o seguinte:

Produto químico em estudo:

- natureza física e propriedades físico-químicas relevantes;
- dados relativos à identificação química, incluindo a pureza.

Espécies sujeitas a ensaio:

- clone (quer tenha sido ou não geneticamente identificado), fornecedor ou fonte (se conhecidos) e condições de cultura utilizadas. Deve registar-se e justificar-se a eventual utilização de uma espécie diferente da *Daphnia magna*.

Condições de realização do ensaio:

- método de ensaio utilizado (por exemplo, semiestático ou por escoamento, o volume, a carga expressa em número de espécimes *Daphnia* por litro),

- fotoperíodo e intensidade da luz;
- plano do ensaio (por exemplo: número de replicados, número de progenitores por replicado);
- dados pormenorizados sobre o meio de cultura utilizado;
- eventuais adições de material orgânico, incluindo a composição, a fonte, o método de preparação, o COT/CQO de preparações de reserva, a estimativa do COT/CQO resultante no meio de ensaio;
- dados pormenorizados sobre a alimentação, incluindo as quantidades (em mg C/*Daphnia*/dia) e a descrição (por exemplo: tipo de alimento(s), incluindo, para as algas, o nome específico (a espécie) e, se conhecidas, a estirpe e as condições de cultura),
- método de preparação das soluções de reserva e frequência de renovação do meio (devem fornecer-se as concentrações do solvente ou dispersante eventualmente utilizado).

Resultados:

- resultados de quaisquer estudos preliminares sobre a estabilidade do produto químico em estudo;
- valor nominal das concentrações de ensaio e resultados de todas as análises para determinar a concentração do produto químico em estudo nos recipientes de ensaio (ver exemplo de folha de dados no apêndice 5); também devem registar-se a eficiência de recuperação do método e o limite de determinação;
- qualidade da água nos recipientes de ensaio (isto é, o pH, a temperatura e a concentração de oxigénio dissolvido, assim como o COT e/ou a CQO e a dureza, quando aplicável) (ver exemplo de folha de dados no apêndice 4);
- registo completo da produção de descendência viva por cada animal progenitor, durante o ensaio (ver exemplo nas folhas de dados do apêndice 4),
- número de animais progenitores mortos e data da morte (ver exemplo de folha de dados no apêndice 4);
- coeficiente de variação da produção de descendência no controlo (com base no número total de descendentes vivos por animal progenitor vivo no fim do ensaio);
- representação gráfica do número total de descendentes vivos produzidos por animal progenitor em cada replicado (com exclusão de qualquer animal progenitor que possa ter morrido acidental ou inadvertidamente durante o ensaio), em função da concentração do produto químico;
- se pertinente, representação gráfica do número total de descendentes vivos produzidos por cada animal progenitor sobrevivente em cada replicado, em função da concentração do produto químico;
- se pertinente, a menor concentração com efeito observável (LOEC) na reprodução, incluindo uma descrição dos métodos estatísticos utilizados, uma indicação da dimensão do efeito que se prevê detetar (para tal, pode efetuar-se uma análise da representatividade estatística antes do início do ensaio) e a concentração sem efeito observável (NOEC) na reprodução; se for caso disso, devem também especificar-se a variável de resposta utilizada para calcular o valor da LOEC e da NOEC (número total de descendentes vivos por organismo materno que não tenha morrido acidental ou inadvertidamente durante o ensaio ou número total de descendentes vivos por organismo materno sobrevivente), bem como a LOEC e a NOEC respeitantes à mortalidade dos animais progenitores;
- quando pertinente, o valor EC_x para a reprodução, os intervalos de confiança (p. ex., 90 % ou 95 %), um gráfico do modelo ajustado que se utilizou para o seu cálculo, o declive da curva concentração-resposta e o seu desvio-padrão;
- outras medições ou efeitos biológicos observados: descrição de qualquer outro efeito biológico que tenha sido observado ou medido (por exemplo, crescimento de animais progenitores), incluindo qualquer justificação apropriada;
- uma explicação para qualquer desvio do método de ensaio.

REFERÊNCIAS

- 1) *Test Guidelines Programme* da OCDE. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.
 - 2) OCDE (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.
 - 3) OCDE (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.
 - 4) OCDE (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.
 - 5) Baird, D.J., *et al.* (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotox. and Environ. Safety*, 21, 257-265.
 - 6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.
 - 7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods
 - 8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 775-782.
 - 9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 — 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA
 - 10) Baird, D.J., *et al.* (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
 - 11) Parkhurst, B.R., J.L. Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26: 1-8.
 - 12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.*, 120(2): 185-196.
 - 13) OCDE (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.
 - 14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 12, 2053-2058.
 - 15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *Arch. Hydrobiol.*, 128, 459-466.
-

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Aplicam-se neste método de ensaio as seguintes definições:

Mortalidade accidental: mortalidade não relacionada com o produto químico, de origem accidental (ou seja, sem causa conhecida).

Produto químico: Substância ou mistura.

Ec_x: a concentração do produto químico em estudo dissolvido em água que provoca uma redução de x % na reprodução dos espécimes de *Daphnia*, durante um período de exposição definido.

Mortalidade por inadvertência: mortalidade não relacionada com o produto químico, de causa desconhecida

Taxa intrínseca de crescimento da população: medida do crescimento da população que integra a produção de descendência e a mortalidade específica da idade (1) (2) (3). Nas populações estáveis, é igual a zero. Nas populações em crescimento, o seu valor será positivo; nas populações em declínio, será negativo. Manifestamente, a última situação não é sustentável e, em última análise, conduzirá à extinção.

Limite de deteção: a menor concentração que pode ser detetada, mas não quantificada.

Limite de determinação: a menor concentração que pode ser medida de forma quantitativa.

Menor concentração com efeito observável (LOEC): a menor concentração testada em que o produto químico produz um efeito observável estatisticamente significativo sobre a reprodução e a mortalidade dos progenitores (a $p < 0,05$), comparativamente ao controlo, durante um período de exposição definido. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter efeito nocivo igual ou superior ao verificado para a LOEC. Quando estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deve ser fornecida uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, consequentemente, a NOEC).

Mortalidade: um animal é considerado morto quando permanece imóvel, isto é, quando não é capaz de nadar ou quando não se observa movimento dos apêndices ou do pós-abdómen num intervalo de 15 segundos após agitação suave do recipiente de ensaio (deve ser mencionada outra definição que se utilize, juntamente com a sua referência).

Concentração sem efeitos observáveis (NOEC): a concentração ensaiada imediatamente abaixo da LOEC, que, quando comparada com o controlo, não tem efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$), durante um período de exposição definido.

Progenitura: os juvenis do género *Daphnia* produzidos pelos animais progenitores no decorrer do ensaio.

Animais progenitores: as fêmeas do género *Daphnia* presentes no início do ensaio e cuja produção de descendência é o objeto do estudo.

Produção de descendência: o número de descendentes vivos produzidos por animais progenitores durante o período de ensaio.

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

Bibliografia

- 1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- 2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- 3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

Apêndice 2

PREPARAÇÃO DOS MEIOS TOTALMENTE DEFINIDOS ELENDT M7 E M4

Aclimação aos meios Elendt M7 e M4

Alguns laboratórios tiveram dificuldades na transferência direta de espécimes *Daphnia* para os meios M4 (1) e M7. No entanto, obteve-se algum sucesso com uma aclimação gradual, isto é, transferindo do próprio meio para Elendt a 30 %, a 60 % e, por fim, a 100 %. Os períodos de aclimação necessários podem atingir a duração de um mês.

Preparação

Elementos vestigiais

Em primeiro lugar, preparam-se soluções de reserva separadas (I) de elementos vestigiais individuais em água com um grau de pureza adequado: por exemplo, desionizada, destilada ou submetida a osmose inversa. A partir destas soluções de reserva individuais (I), é preparada uma segunda solução de reserva simples (II), que contém todos os elementos vestigiais (solução combinada), isto é:

Solução ou soluções de reserva I (substância simples)	Quantidade adicionada à água	Concentração (em relação ao meio M4)	Para preparar a solução de reserva combinada II, adicionar a seguinte quantidade de solução de reserva I à água	
			ml/l	
	mg/l		M 4	M 7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000 vezes	1,0	0,25
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	7 210	20 000 vezes	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 vezes	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000 vezes	1,0	0,25
SrCl ₂ · 6 H ₂ O	3 040	20 000 vezes	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 vezes	1,0	0,25
MoNa ₂ O ₄ · 2 H ₂ O	1 260	20 000 vezes	1,0	0,25
CuCl ₂ · 2H ₂ O	335	20 000 vezes	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000 vezes	1,0	1,0
CoCl ₂ · 6H ₂ O	200	20 000 vezes	1,0	1,0
KI	65	20 000 vezes	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000 vezes	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000 vezes	1,0	1,0
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	5 000	2 000 vezes	—	-
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1 991	2 000 vezes	—	-

Ambas as soluções de Na₂EDTA e FeSO₄ são preparadas individualmente, juntas e imediatamente autoclavadas, o que dá:

solução Fe-EDTA		1 000 vezes	20,0	5,0
-----------------	--	-------------	------	-----

Meios M4 e M7

Os meios M4 e M7 são preparados utilizando a solução de reserva II, os macronutrientes e as vitaminas, tal conforme a seguir se indica:

	Quantidade adicionada à água	Concentração (em relação ao meio M4)	Quantidade de solução de reserva adicionada para preparar o meio	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Soluções de reserva II (combinação de elementos vestigiais)		20 vezes	50	50
Soluções-padrão de macronutrientes (uma só substância)				
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293 800	1 000 vezes	1,0	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246 600	2 000 vezes	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 vezes	0,1	0,1
NaHCO_3	64 800	1 000 vezes	1,0	1,0
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	50 000	5 000 vezes	0,2	0,2
NaNO_3	2 740	10 000 vezes	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000 vezes	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 vezes	0,1	0,1
Solução de reserva de vitaminas	-	10 000 vezes	0,1	0,1

A solução-padrão de vitaminas prepara-se juntando as três vitaminas a 1 litro de água, conforme a seguir se indica:

	mg/l			
Cloridrato de tiamina	750	10 000 vezes		
Cianocobalamina (B_{12})	10	10 000 vezes		
Biotina	7,5	10 000 vezes		

A solução de reserva de vitaminas é armazenada e congelada em pequenas alíquotas. As vitaminas são adicionadas ao meio imediatamente antes da utilização.

Nota: Para evitar a precipitação dos sais quando se prepara o meio completo, adicionar as alíquotas de soluções de reserva a cerca de 500-800 ml de água desionizada e perfazer até 1 litro.

N.N.B. A primeira publicação relativa ao meio M4 tem a seguinte referência: Elendt, B.P (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

Apêndice 3

ANÁLISE DO CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT) E PRODUÇÃO DE UM NOMOGRAMA PARA O TEOR COT DAS ALGAS QUE SERVEM DE ALIMENTO

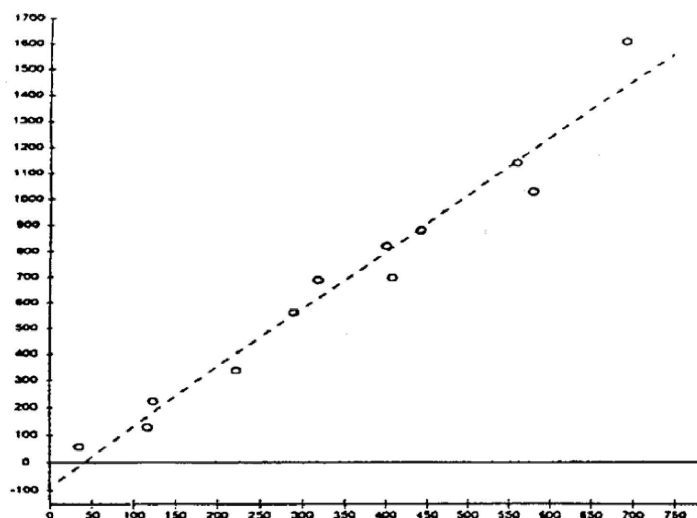
Reconhece-se que o teor de carbono das algas que servem de alimento não será normalmente medido diretamente, mas sim através de correlações (isto é, nomogramas) com medições alternativas, tais como o número de células de algas ou a absorvância.

O COT deve ser medido por oxidação a alta temperatura, em vez de se utilizarem métodos com UV ou persulfato (ver: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Para a elaboração do nomograma, as algas devem ser separadas do meio de crescimento por centrifugação, seguida de ressuspensão em água destilada. Medir o parâmetro de substituição e a concentração de COT em cada amostra em triplicado. Devem ser analisados brancos de água destilada, e a concentração de COT deve ser deduzida a partir da concentração de COT presente na amostra de algas.

Os nomogramas devem ser lineares em toda a gama de concentrações de carbono necessária. Indicam-se a seguir alguns exemplos.

N.B. Estes exemplos não devem ser aproveitados para efetuar conversões; é essencial que os laboratórios preparem os seus próprios nomogramas.



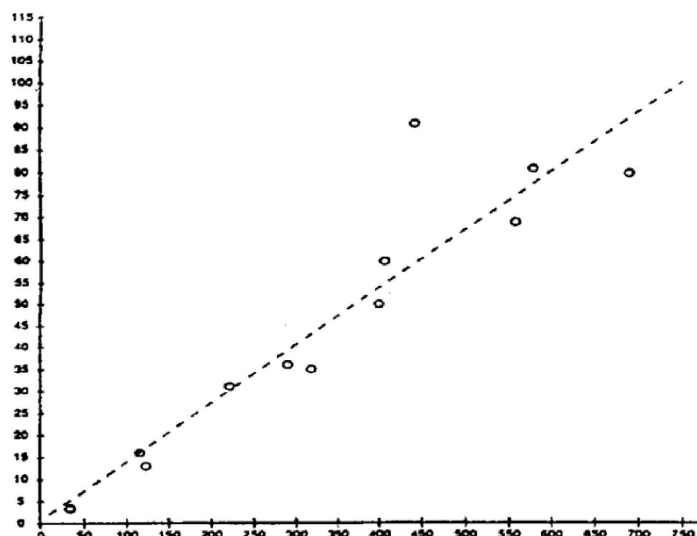
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regressão de mg/l (peso seco) em mg C/l. Dados obtidos a partir de suspensões concentradas de células cultivadas em sistema semicontínuo, ressuspensas em água destilada

Eixo das abcissas: mg C/l de algas concentradas utilizadas como alimento

Eixo das ordenadas: mg/l de massa seca de algas concentradas utilizadas como alimento

Coefficiente de correlação -0,980



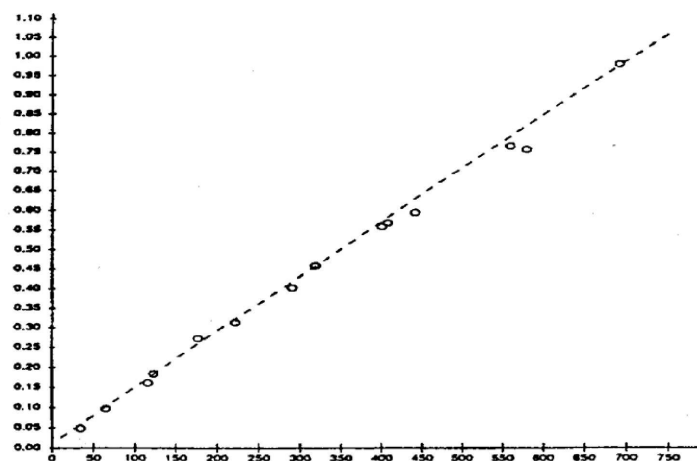
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regressão do número de células em mg C/l. Dados obtidos a partir de suspensões concentradas de células cultivadas em sistema semicontínuo, ressuspensas em água destilada

Eixo das abcissas: mg C/l de algas concentradas utilizadas como alimento

Eixo das ordenadas: número de células/l de algas concentradas utilizadas como alimento

Coefficiente de correlação -0,926



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regressão da absorvância em mg C/l (células com 1 cm de comprimento). Dados obtidos a partir de suspensões concentradas de células cultivadas em sistema semicontínuo, ressuspensas em água destilada

Eixo das abcissas: mg C/l de algas concentradas utilizadas como alimento

Eixo das ordenadas: absorvância a 440 nm de uma diluição 1/10 de algas concentradas utilizadas como alimento

Coefficiente de correlação - 0,998

EXEMPLO DE FOLHAS DE DADOS COM REGISTO DA RENOVAÇÃO DOS MEIOS, DADOS DE MONITORIZAÇÃO FÍSICA/QUÍMICA, ALIMENTAÇÃO, REPRODUÇÃO DE DAPHNIA E MORTALIDADE DE PROGENITORES

Experiência número:	Data do início:					Clone:				Meio:				Tipo de alimento				Produto químico em estudo:				Concentração nominal:		
Dia	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Renovação do meio (assinalar os dias)																								
pH (*)																							novo	
																							antigo	
O ₂ (mg/l) (*)																							novo	
																							antigo	
Temperatura (°C) (*)																							novo	
																							antigo	
Alimentos fornecidos (assinalar os dias)																								
Número de descendentes vivos (**)																								Total
ReRecipiente 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Total	
Mortalidade cumulativa dos progenitores (***)																								

(*) Indicar recipiente utilizado na experiência.
 (**) Registar ovos abortados como «AB» na casa correspondente
 (***) Registar eventual mortalidade dos animais progenitores como «M» na casa correspondente

Apêndice 6

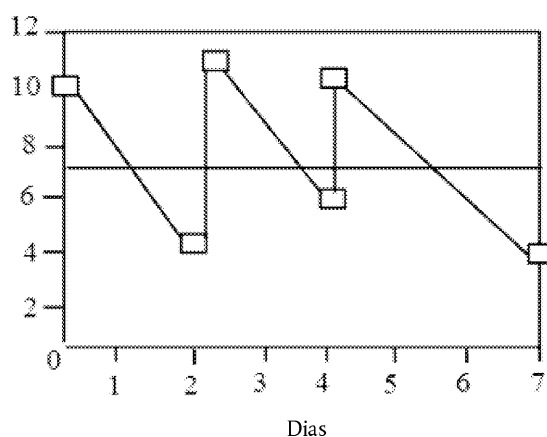
CÁLCULO DA MÉDIA PONDERADA EM FUNÇÃO DO TEMPO

Média ponderada em função do tempo

Considerando que a concentração do produto químico em estudo pode diminuir durante o período que decorre entre renovações do meio, é necessário determinar um valor de concentração representativo da gama de concentrações a que os progenitores *Daphnia* foram expostos. A determinação desse valor deve basear-se em considerações tanto biológicas como estatísticas. Por exemplo, se se considerar que a reprodução é afetada principalmente pela concentração máxima experimentada, deverá utilizar-se a concentração máxima. No entanto, se se considerar que o efeito acumulado ou a longo prazo da substância tóxica tem peso mais importante, será mais adequado utilizar um valor médio de concentração. Neste caso, o valor adequado será o da concentração média ponderada em função do tempo, uma vez que tem em conta a variação da concentração instantânea ao longo do tempo.

Figura 1

Exemplo de média ponderada em função do tempo



A figura 1 mostra um exemplo de ensaio (simplificado) com a duração de sete dias, em que o meio é renovado nos dias 0, 2 e 4.

- A linha em ziguezague representa a concentração ao longo do tempo. Assume-se que a queda da concentração segue uma curva exponencial.
- Os seis pontos expressos no gráfico representam as concentrações medidas no início e no fim de cada período de renovação.
- A linha mais espessa indica a posição da média ponderada em função do tempo.

A média ponderada em função do tempo é calculada de modo a que a área abaixo dessa linha seja igual à área abaixo da curva de concentração. O quadro 1 apresenta em pormenor o cálculo correspondente ao exemplo da figura 1.

Quadro 1

Cálculo da média ponderada em função do tempo

Renovação N.º	Dias	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Área
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544

Renovação N.º	Dias	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Área
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Número total de dias:	7				Área total:	50,092
					Média ponderada em função do tempo:	7,156

A coluna *Dias* corresponde ao número de dias no período de renovação.

A coluna *Conc 0* corresponde à concentração medida no início de cada período de renovação.

A coluna *Conc 1* corresponde à concentração medida no final de cada período de renovação.

A coluna *Ln(Conc 0)* corresponde ao logaritmo natural de *Conc 0*.

A coluna *Ln(Conc 1)* corresponde ao logaritmo natural de *Conc 1*.

A coluna *Área* corresponde à área abaixo da curva exponencial para cada período de renovação. É calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Área} = \frac{\text{Conc 0} - \text{Conc 1}}{\text{Ln}(\text{Conc 0}) - \text{Ln}(\text{Conc 1})} \times \text{Dia}$$

A média ponderada em função do tempo (MPFT) é a *área total* dividida pelo *total de dias*.

Para o ensaio de reprodução de *Daphnia*, o quadro deve, logicamente, ser aumentado de modo a abranger 21 dias.

É óbvio que, quando as observações se limitam ao início e ao final de cada período de renovação, não é possível confirmar se o decaimento segue, de facto, uma curva exponencial. Uma curva diferente resultará num cálculo diferente para os valores da *área*. No entanto, o decaimento segundo uma curva exponencial constitui um modelo plausível que, na ausência de outras informações, constituirá provavelmente a curva mais adequada.

É, porém, necessário tomar algum cuidado no caso de a análise química não permitir detetar o produto químico no final do período de renovação. A menos que se possa estimar a velocidade a que o produto químico desapareceu da solução, é impossível obter uma área realista abaixo da curva e, consequentemente, uma média ponderada em função do tempo que seja razoável.

Apêndice 7

ORIENTAÇÕES PARA A IDENTIFICAÇÃO DO SEXO DOS NEONATOS

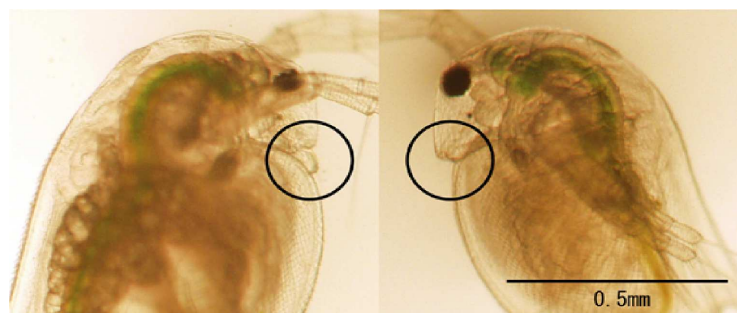
A produção de machos neonatos pode ocorrer em diferentes condições ambientais, tais como o encurtamento do período de irradiação, temperatura, concentração alimentar decrescente, e aumento da densidade populacional (Hobaek e Larson, 1990; Kleiven *et al.*, 1992). A produção de machos constitui também uma resposta a certos reguladores do crescimento de insetos (Oda *et al.*, 2005). Em condições nas quais fatores de stress químico induzam um decréscimo na produção de descendência das fêmeas partenogêneas, é de prever a ocorrência de um maior número de machos (OCDE, 2008). As informações disponíveis mostram não ser possível prever qual dos rácios entre sexos ou dos parâmetros de reprodução serão mais sensíveis; há, contudo, indícios (referência «relatório de validação», parte 1) de que o aumento do número de machos pode ser menos sensível do que a diminuição da descendência. Dado que o principal objetivo do método de ensaio consiste em avaliar o número de descendentes produzidos, a ocorrência de machos constitui uma observação opcional. Se este parâmetro facultativo for avaliado no contexto de um estudo, deve utilizar-se como critério adicional de validade do ensaio a ocorrência de não mais de 5 % de machos nos controlos.

A forma mais prática e fácil de diferenciar o sexo dos espécimes de *Daphnia* consiste em utilizar as suas características fenotípicas, pois os machos e as fêmeas são geneticamente idênticos, sendo o sexo determinado pelas condições ambientais. Machos e fêmeas diferem em termos de comprimento e morfologia das primeiras antenas, que são mais longas nos primeiros do que nas segundas (figura 1). Esta diferença é observável imediatamente após o nascimento, embora outras características sexuais secundárias evoluam à medida que os espécimes se desenvolvem (ver, p. ex., figura 2 em Olmstead e LeBlanc, 2000).

Para observar o sexo morfológico, os neonatos produzidos por cada animal de experimentação devem ser transferidos por recurso a uma pipeta e colocados numa placa de Petri com meio de ensaio. O meio é mantido a um nível mínimo, para restringir os movimentos dos animais. As primeiras antenas podem ser observadas por recurso a um microscópio estereoscópico ($\times 10$ -60).

Fig. 1

Macho (lado esquerdo) e fêmea (lado direito) de *D. magna* com 24 horas. Os machos podem ser distinguidos das fêmeas pelo comprimento e a morfologia das primeiras antenas, conforme indicado nos círculos (Tatarazako *et al.*, 2004).



REFERÊNCIAS

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. 61:1168-1174.

OCDE 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). *Toxicological Sciences* 17, 439-449.»

18) Na parte C, capítulo C.29, o ponto 66 passa a ter a seguinte redação:

«66. Um ensaio é considerado válido se:

- a) a percentagem média de degradação nos recipientes F_c que contêm o produto químico de referência (FC) for superior a 60 % até ao 14.º dia de incubação; e
- b) a quantidade média de CIT presente nos ensaios em branco (F_b) no final do ensaio for inferior 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, se se registar uma elevada produção de carbono inorgânico no ensaio em branco, deve seguir-se o procedimento indicado nos pontos 27 a 32.»

19) Na parte C, são aditados os seguintes capítulos:

«C.47 Ensaio de toxicidade nos primeiros estádios de vida em peixes

INTRODUÇÃO

1. Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 210 (2013) da OCDE. Os ensaios realizados em peixes nos primeiros estádios de vida destinam-se a determinar os efeitos letais e subletais de produtos químicos nas espécies estudadas, nas fases vitais correspondentes. Estes ensaios permitem obter informações preciosas para a previsão de efeitos letais e subletais do produto químico em causa noutras espécies de peixes.
2. O *Test Guideline* 210 baseia-se numa proposta apresentada pelo Reino Unido, examinada numa reunião de peritos da OCDE que teve lugar em Medmenham, no Reino Unido, em novembro de 1988 e posteriormente atualizada (em 2013), para espelhar a experiência adquirida na utilização deste ensaio e as recomendações formuladas numa sessão sobre ensaios de toxicidade em peixes, que a OCDE organizou em setembro de 2010 (1).

PRINCÍPIO DO ENSAIO

3. Expõem-se peixes nos primeiros estádios de vida a uma gama de concentrações do produto químico em estudo dissolvido em água. São preferíveis condições de fluxo contínuo, mas, se não forem possíveis, admitem-se condições semiestáticas. Para mais informações, pode consultar-se o documento de orientações da OCDE sobre ensaios de toxicidade em meio aquático de substâncias e misturas difíceis (2). O ensaio começa com a colocação de ovos fertilizados em cubas de ensaio e decorre durante o período, adaptado à espécie em estudo, necessário para os peixes de controlo atingirem o estágio juvenil. Avaliam-se os efeitos letais e subletais e comparam-se com os valores correspondentes ao grupo de controlo, a fim de determinar a LOEC (menor concentração com efeitos observáveis) e, em seguida, a NOEC (concentração sem efeitos observáveis) e/ou a CE_x (por exemplo: CE_{10} ou CE_{20}), recorrendo a um modelo de regressão para estimar a concentração causadora de uma variação de x % no efeito medido. Os parâmetros e concentrações associados a efeitos a mencionar nos relatórios podem ser condicionados pelo quadro regulamentar aplicável. As concentrações ensaiadas devem abranger a CE_x , para que esta seja determinada por interpolação e não por extrapolação (ver definições no apêndice 1).

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

4. Entende-se por «produto químico em estudo» aquilo que é ensaiado. É necessário conhecer a hidrossolubilidade (capítulo A.6 deste anexo) e a pressão de vapor (capítulo A.4 deste anexo) do produto químico em estudo, devendo dispor-se de um método analítico fiável para a determinação quantitativa do produto químico nas soluções de ensaio, cujos limite de quantificação e exatidão sejam conhecidos e estejam descritos. Embora não necessário, um ensaio de toxicidade aguda (ver os capítulos C.1 ou C.49 deste anexo) pode fornecer informações úteis (a ser realizado, sê-lo-á de preferência nas espécies escolhidas para este ensaio).

5. Se se utilizar este método de ensaio para estudar uma mistura, é necessário caracterizar o mais possível a composição desta, nomeadamente a identidade química, a ocorrência quantitativa e as propriedades enquanto substância (como as acima referidas) dos seus componentes. Antes de o utilizar para ensaios normativos de uma mistura, deve ponderar-se se o método gerará resultados aceitáveis para os fins normativos pretendidos.
6. A fórmula estrutural, o grau de pureza da substância, a hidrossolubilidade, a estabilidade em água e à luz, o pK_a , o P_{ow} e os resultados de um ensaio de biodegradabilidade «fácil» (segundo os capítulos C.4 e C.29 deste anexo, por exemplo) constituem informações úteis.

VALIDADE DO ENSAIO

7. Para que um ensaio possa considerar-se válido, têm de ser cumpridas as seguintes condições:
 - concentração de oxigénio dissolvido, ao longo de todo o ensaio, superior a 60 % do valor da saturação com ar;
 - diferença de temperatura da água entre as diversas cubas de ensaio ou entre dias consecutivos não superior a $\pm 1,5$ °C em qualquer momento do ensaio, mantendo-se ainda a temperatura da água na gama de temperaturas especificada para a espécie utilizada (apêndice 2);
 - determinação analítica das concentrações experimentais;
 - taxa global de sobrevivência dos ovos fertilizados e após a eclosão, do grupo de controlo e, quando aplicável, do grupo de controlo do solvente, igual ou superior aos limites definidos no apêndice 2.
8. Caso se observe um pequeno desvio dos critérios de validade, analisam-se as consequências na fiabilidade dos dados do ensaio e inclui-se essa análise no relatório. Os efeitos na sobrevivência, na eclosão ou no crescimento verificados no grupo de controlo do solvente, comparativamente ao grupo de controlo negativo, devem ser discutidos numa perspetiva de fiabilidade dos dados do ensaio e incluídos no relatório.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Cubas de ensaio

9. Podem utilizar-se quaisquer cubas de vidro, de aço inoxidável ou de outro material quimicamente inerte. Dada a forte capacidade que o silicone reconhecidamente tem de absorver substâncias lipofílicas, deve reduzir-se ao mínimo a utilização de tubagens de silicone nos estudos de fluxo contínuo e a utilização de vedações de silicone em contacto com água, recorrendo para o efeito, por exemplo, a aquários de vidro em monobloco. As dimensões das cubas devem ser suficientes para permitir um crescimento adequado nas cubas de controlo, para que a concentração de oxigénio dissolvido se mantenha (o que, por exemplo, no caso de espécies de peixes pequenas, se consegue com cubas de 7 l) e para que os critérios de taxa de carga referidos no ponto 19 sejam respeitados. É desejável que as cubas de ensaio sejam posicionadas de forma aleatória na área de ensaio. Porém, em vez de uma disposição completamente aleatória, é preferível uma organização por blocos e uma disposição aleatória em cada bloco, estando todas as concentrações de exposição presentes em cada bloco. As cubas de ensaio devem estar protegidas contra perturbações indesejadas. É preferível que, antes da introdução dos organismos, o sistema de ensaio seja exposto às concentrações previstas do produto químico em estudo durante um período suficiente para comprovar a estabilidade dessas concentrações.

Escolha das espécies

10. O quadro 1 refere as espécies de peixes recomendadas. Podem ser utilizadas outras, mas o protocolo de ensaio poderá ter de ser adaptado de modo a proporcionar condições de ensaio adequadas. Nesse caso, será necessário fundamentar a escolha da espécie e descrever o método experimental.

Manutenção dos peixes reprodutores

11. O apêndice 3 e as referências (3) (4) e (5) contêm elementos sobre a manutenção dos reprodutores em condições satisfatórias.

Manipulação de ovos fertilizados, embriões e larvas

12. Inicialmente, os ovos fertilizados, os embriões e as larvas podem ser expostos em cubas de vidro ou de aço inoxidável mais pequenas, dispostas no interior da cuba principal e cujos lados ou extremidades sejam constituídos por uma rede que possibilite o fluxo da solução em estudo através de cada cuba. Uma forma de criar um fluxo não-turbulento através dessas cubas mais pequenas consiste em pendurá-las num braço que as movimente para cima e para baixo, mas mantenha os organismos sempre submersos. Os ovos fertilizados de salmonídeos podem ser colocados em suportes ou redes com orifícios suficientemente largos para permitir que as larvas saiam após a eclosão.
13. Quando se utilizam recipientes, grelhas ou malhas para confinar os ovos na cuba de ensaio principal, esses dispositivos devem ser removidos após a eclosão das larvas, seguindo as orientações do apêndice 3, com exceção das malhas necessárias para evitar que as larvas escapem. Se for necessário transferi-las, as larvas não devem ser expostas ao ar. Também não devem ser utilizadas redes para retirar larvas de recipientes de ovos. O momento adequado para efetuar a transferência varia de espécie para espécie e deve ser referido no relatório. Todavia, esta transferência nem sempre é necessária.

Água

14. Pode utilizar-se nos ensaios qualquer água na qual a espécie em estudo apresente taxas adequadas de crescimento e de sobrevivência a longo prazo (ver o apêndice 4). A qualidade da água deve manter-se constante durante o ensaio. Para assegurar que a água de diluição não influencia indevidamente o resultado do ensaio (por exemplo por complexação do produto químico em estudo) nem afeta negativamente o desempenho dos progenitores, devem ser colhidas regularmente amostras para análise. Deve determinar-se o teor de metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni etc.), dos principais aniões e cатиões (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} etc.), de amoníaco, de pesticidas clorados residuais totais, de carbono orgânico total e de sólidos em suspensão. Caso se saiba que a qualidade da água de diluição se mantém relativamente constante, estas medições podem realizar-se, por exemplo, duas vezes por ano. Caso se saiba que a qualidade da água varia, as medições têm de ser mais frequentes, dependendo da frequência do grau dessa variabilidade. No apêndice 4 apresentam-se algumas características químicas de uma água de diluição aceitável.

Soluções utilizadas no ensaio

15. Nos ensaios de fluxo contínuo, tendo em vista a manutenção da série pretendida de concentrações nas cubas utilizadas no ensaio, é necessário um sistema que forneça e dilua continuamente uma solução de reserva do produto químico em estudo (por exemplo: por meio de uma bomba doseadora, de um diluidor proporcional ou de um sistema saturador). Os caudais das soluções de reserva e da água de diluição devem ser verificados regularmente durante o ensaio e não devem variar mais de 10 % ao longo do ensaio. Considera-se adequado um caudal equivalente a, pelo menos, o volume de cinco cubas de ensaio em 24 horas (3). Todavia, se a taxa de carga especificada no ponto 19 for respeitada, admite-se um caudal inferior (por exemplo: o volume de duas a três cubas em 24 horas), para evitar o rápido arrastamento da comida.
16. Preparam-se as soluções a utilizar nos ensaios por diluição de uma solução de reserva até à concentração escolhida. Preferencialmente, prepara-se a solução de reserva por simples mistura ou agitação do produto químico na água de diluição, utilizando meios mecânicos (agitação e/ou dispersão ultrassônica, por exemplo). Podem ser utilizadas colunas de saturação (colunas de solubilidade) ou métodos de dosagem passivos (6) para obter soluções de reserva de concentração adequada. Não se recomenda a utilização de solventes, mas, se for necessário um solvente, há que ensaiá-lo em paralelo, com a mesma concentração de solvente que nas cubas de exposição ao produto químico em estudo; de preferência, a concentração do solvente deve ser a mesma em todas as cubas de exposição e nas cubas de controlo do solvente. No caso de alguns sistemas de diluição, isto pode ser tecnicamente difícil. Em tal caso, a concentração de solvente nas cubas de controlo do solvente deve ser igual à maior concentração de solvente nas cubas de exposição. No caso das substâncias difíceis de ensaiar, deve consultar-se o documento de orientações da OCDE n.º 23, relativo a ensaios de toxicidade em meio aquático de substâncias e misturas difíceis (2). A escolha do solvente eventualmente utilizado depende das propriedades químicas da substância em causa. O documento de orientações da OCDE n.º 23 recomenda que não se ultrapasse a concentração de 100 µl/l. Para evitar eventuais efeitos do solvente nos parâmetros medidos (7), recomenda-se que a concentração do solvente seja a menor possível.
17. No ensaio em condições semiestáticas, podem ser adotados dois métodos de renovação diferentes: ou se preparam novas soluções de ensaio em cubas limpas e se transferem cautelosamente os ovos e larvas sobreviventes para as novas cubas; ou se mantêm os organismos em estudo nas cubas de ensaio e se renova diariamente uma parte (pelo menos dois terços) do volume da solução em estudo ou da solução de controlo.

PROTOCOLO DE ENSAIO

Condições de exposição*Duração*

18. Inicia-se o ensaio o mais rapidamente possível após a fertilização dos ovos, sendo preferível imergi-los nas soluções em estudo antes de iniciada a segmentação do blastodisco ou o mínimo de tempo possível após esse estágio. A duração do ensaio dependerá da espécie utilizada. Recomendam-se algumas durações no apêndice 2.

Carga

19. O número de ovos fertilizados no início do ensaio deve ser suficiente para cumprir os requisitos estatísticos. Os ovos devem ser distribuídos aleatoriamente pelos grupos de exposição; o número mínimo de ovos por nível de concentração é de 80, igualmente divididos por, pelo menos, quatro cubas de ensaio replicadas. A taxa de carga (biomassa por volume de solução de ensaio) deve ser suficientemente baixa para que a concentração de oxigénio dissolvido se mantenha a, pelo menos, 60 % do valor de saturação com ar, sem necessidade de arejamento, durante os estádios embrionário e larvar. Para os ensaios de fluxo contínuo, recomenda-se uma taxa de carga não superior a 0,5 g/l (peso húmido) em 24 horas e sempre não superior a 5 g/l de solução (3).

Luz e temperatura

20. O fotoperíodo e a temperatura da água devem ser adequados à espécie utilizada no ensaio (ver o apêndice 2).

Alimentação

21. O regime alimentar dos peixes é um aspeto da maior importância, sendo essencial fornecer o alimento adequado a cada estágio vital, a partir do momento certo, em quantidade suficiente para um crescimento normal. A alimentação deve ser aproximadamente a mesma nos vários replicados, a menos que seja adaptada em função da mortalidade. Para evitar a acumulação de resíduos, removem-se o excesso de alimento e as fezes sempre que necessário. O apêndice 3 descreve determinados regimes alimentares, mas o objetivo prosseguido é o aperfeiçoamento contínuo dos regimes alimentares em função da experiência adquirida, de modo a melhorar a taxa de sobrevivência e otimizar o crescimento. Os alimentos vivos enriquecem o ambiente; por conseguinte, devem ser utilizados em vez de alimentos secos ou congelados, ou em complemento destes, sempre que isso se adegue à espécie e ao estágio vital em causa.

Concentrações ensaiadas

22. Normalmente, utilizam-se cinco concentrações do produto químico em estudo, intervaladas por um fator constante não superior a 3,2, com um mínimo de quatro replicados por nível de concentração. Para se escolher a gama de concentrações a ensaiar, devem ser tidas em conta as informações eventualmente disponíveis provenientes de ensaios de toxicidade aguda, de preferência na mesma espécie, ou pode realizar-se um ensaio exploratório daquela gama (1). Todavia, no processo de escolha da gama de concentrações a ensaiar, devem ser tidas em conta todas as fontes de informação, designadamente as provenientes de métodos comparativos por interpolação ou dados de ensaios de toxicidade aguda em embriões de peixes. Caso se pretenda definir apenas NOEC empíricas, pode ser aceitável, como ensaio definitivo, um ensaio do limite, ou um ensaio do limite alargado, de menos de cinco concentrações. A utilização de menos de cinco concentrações carece de justificação. Não é necessário ensaiar concentrações do produto químico em estudo que excedam a CL₅₀ às 96 horas ou 10 mg/l, prevalecendo como critério o valor mais baixo.

Controlos

23. Além do ensaio da série de concentrações do produto químico em estudo (ponto 16), deve realizar-se um ensaio de controlo da água de diluição e, se necessário, um ensaio de controlo do solvente utilizado.

Frequência das medições e das determinações analíticas

24. Antes de iniciar o período de exposição, é necessário verificar se o sistema de distribuição do produto químico está a funcionar bem em todos os replicados (por exemplo medindo as concentrações a ensaiar). Os métodos analíticos necessários devem estar bem estabelecidos, incluindo um limite de quantificação adequado e um conhecimento suficiente da estabilidade da substância no sistema de ensaio. Durante o ensaio, determinam-se as concentrações do produto químico em estudo a intervalos regulares, para caracterizar a exposição. São necessárias, pelo menos, cinco determinações. No caso dos sistemas de fluxo contínuo, deve realizar-se, pelo menos uma vez por semana, uma determinação analítica do produto químico em estudo num replicado de cada nível de concentração, de cada vez num replicado diferente. A realização de mais determinações analíticas melhora, em geral, a qualidade dos resultados do ensaio. Para garantir que as determinações do produto químico se realizam na verdadeira solução do mesmo, pode ser necessário filtrar as amostras, para remover eventuais partículas (utilizando filtros com porosidade de 0,45 µm, por exemplo), ou centrifugá-las. Para reduzir a adsorção do produto químico em estudo, os filtros devem ser previamente saturados. Se as concentrações medidas se desviarem do intervalo de 80-120 % da concentração nominal, as concentrações associadas a efeitos devem ser determinadas e expressas do seguinte modo: no caso dos ensaios por fluxo contínuo, em relação à média aritmética das concentrações (ver o cálculo da média aritmética no apêndice 6 do método C.20 (8)); no caso dos ensaios semiestáticos, em relação à média geométrica das concentrações medidas (ver o capítulo 5 do documento de orientações da OCDE relativo a ensaios de toxicidade em meio aquático de substâncias e misturas difíceis (2)).
25. Durante o ensaio, medem-se, pelo menos semanalmente, o oxigénio dissolvido, o pH e a temperatura em cada cuba; se necessário, medem-se a salinidade e a dureza no início e no final do ensaio. De preferência, monitoriza-se a temperatura continuamente em, pelo menos, uma cuba de ensaio.

Exames

26. **Estádio embrionário:** O estágio embrionário no início da exposição ao produto químico em estudo deve ser verificado com o máximo de rigor possível. Pode utilizar-se para o efeito uma amostra representativa de ovos adequadamente limpos e conservados.
27. **Eclosão e sobrevivência:** O exame da eclosão e da sobrevivência deve ser, pelo menos, diário, registando-se os números apurados. Caso se observem fungos nos ovos no início do desenvolvimento embrionário (por exemplo no primeiro ou no segundo dias do ensaio), os ovos em causa devem ser contados e retirados. Removem-se os embriões, larvas e peixes juvenis mortos logo que se detetem, pois podem decompor-se rapidamente e ser despedaçados pelos outros peixes. A remoção dos indivíduos mortos deve ser extremamente cuidadosa, de modo a não danificar os ovos e larvas vizinhos. Os sinais de morte dependem da espécie e do estágio vital. Por exemplo:
- ovos fertilizados: particularmente nos estádios iniciais, acentuada perda de translucidez e alteração da coloração, causadas por coagulação e/ou precipitação de proteínas e conduzindo a um aspeto branco opaco;
 - embriões, larvas e peixes juvenis: imobilidade e/ou ausência de movimentos respiratórios e/ou ausência de batimentos cardíacos e/ou ausência de reação a estímulos mecânicos.
28. **Aspeto anómalo:** A intervalos adequados, em função da duração do ensaio e da natureza da anomalia, regista-se o número de larvas ou de peixes juvenis que apresentem anomalias de forma corporal. A ocorrência de larvas e peixes juvenis com anomalias é um fenómeno natural, podendo, nalgumas espécies, afetar alguns pontos percentuais dos efetivos do(s) grupo(s) de controlo. Caso se considere que as deformações e o comportamento anormal associado são tais que causam sofrimento considerável ao organismo, tendo este ultrapassado o ponto de reversibilidade, o organismo em causa pode ser retirado do ensaio. Os animais nessas condições devem ser eutanasiados, tratando-se como casos de mortalidade na subsequente análise de dados. O desenvolvimento embrionário normal da maior parte das espécies recomendadas neste método de ensaio está descrito na bibliografia (9) (10) (11) (12).
29. **Comportamento anómalo:** A intervalos adequados, consoante a duração do ensaio (por exemplo: uma vez por dia, no caso das espécies de água quente), registam-se todas as anomalias detetadas, como hiperventilação, natação descoordenada e alimentação ou inatividade atípicas. Estes efeitos, embora de difícil quantificação, podem, quando observados, ser úteis na interpretação dos dados de mortalidade.

30. **Peso:** No final do ensaio, pesam-se os peixes sobreviventes, pelo menos por replicado (registando-se o número de peixes presentes no replicado e o peso médio por peixe): é preferível o peso húmido (enxuto), mas também pode indicar-se no relatório o peso seco (13).
31. **Comprimento:** No termo do ensaio, mede-se cada peixe. Recomenda-se a medição do comprimento total; se, no entanto, a barbatana caudal apresentar sinais de decomposição ou de erosão, pode optar-se pelo comprimento normalizado. O método utilizado deve ser o mesmo para todos os peixes participantes no ensaio. Pode medir-se o comprimento de cada peixe com o auxílio de um paquímetro, de uma máquina fotográfica digital ou de um micrómetro ocular calibrado. Indicam-se no apêndice 2 os comprimentos mínimos habituais.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

32. Se for necessário determinar a NOEC, recomenda-se que a capacidade do protocolo experimental e do teste estatístico escolhido para detetar alterações de importância biológica nos parâmetros se situe, pelo menos, ao nível de 80 %. Os parâmetros e concentrações associados a efeitos a mencionar nos relatórios podem ser condicionados pelo quadro regulamentar aplicável. Se for necessário determinar uma CE_x , o protocolo experimental e o modelo de regressão escolhido devem permitir que essa concentração seja estimada nas seguintes condições: i) o intervalo de confiança a 95 % da CE_x não compreende o valor zero e não é demasiado amplo; ii) o intervalo de confiança a 95 % da média prevista à concentração CE_x não compreende a média do grupo de controlo; iii) o modelo de regressão não está significativamente desajustado dos dados. Em ambos os casos, é necessário precisar a variação percentual de cada parâmetro que importa detetar ou estimar. O protocolo experimental deve possibilitá-lo. Se as condições enunciadas para a determinação da CE_x não forem satisfeitas, deve optar-se pela NOEC. É improvável que a mesma variação percentual ocorra em todos os parâmetros e que seja possível conceber uma experiência realizável que satisfaça os referidos critérios para todos os parâmetros. Por conseguinte, a experiência deve ser concebida de modo a concentrar-se adequadamente nos parâmetros que nela sejam importantes. Os apêndices 5 e 6 contêm orientações e fluxogramas estatísticos para ambos os casos, úteis para orientar o tratamento dos dados e a escolha do modelo ou teste estatístico mais adequado a utilizar. Admitem-se outras abordagens estatísticas, desde que cientificamente justificadas.
33. É necessário analisar as variações em cada série de replicados, efetuando uma análise de variância ou recorrendo a tabelas de contingência, e utilizar os métodos de análise estatística que aquela aconselhe. Para efeitos de comparações múltiplas entre os resultados obtidos para cada concentração e os resultados obtidos para o grupo de controlo, recomendam-se os testes regressivos de Jonckheere-Terpstra ou de Williams, no caso das respostas contínuas, e o teste regressivo de Cochran-Armitage, no caso das respostas quantais compatíveis com uma relação concentração-resposta monótona e sem indícios de variância extrabinomial (14). Se houver indícios de variância extrabinomial, recomendam-se a modificação de Rao-Scott do teste de Cochran-Armitage (15) (16) ou os testes de Williams ou de Dunnett (após transformação arcosseno da raiz quadrada) ou de Jonckheere-Terpstra, aplicados às proporções associadas a cada replicado. Se os dados não forem compatíveis com uma relação monótona concentração-resposta, os métodos de Dunnett, de Dunn ou de Mann-Whitney poderão ser úteis no caso das respostas contínuas e o teste exato de Fisher no caso das respostas quantais (14) (17) (18). Ao aplicar um método ou modelo estatístico, há que verificar se todos os requisitos do modelo ou método são satisfeitos (por exemplo, a variabilidade de cuba para cuba é estimada e tida em conta no protocolo experimental e no modelo ou teste estatístico utilizado). O grau de normalidade dos dados deve ser avaliado; o apêndice 5 indica o tratamento a dar aos resíduos de uma ANOVA. O apêndice 6 contém elementos adicionais relativos à regressão. Deve ponderar-se a necessidade de transformações para satisfazer os requisitos do teste estatístico. No entanto, as transformações com vista ao ajustamento de um modelo de regressão exigem grande cuidado, uma vez que, por exemplo, uma variação de 25 % na resposta não-transformada não corresponde a uma variação de 25 % na resposta transformada. Em todas as análises, é a cuba de ensaio, e não o peixe, que constitui a unidade de análise e a unidade experimental, facto que tanto os testes de hipóteses como as regressões têm de espelhar (3) (14) (19) (20).

Relatório do ensaio

34. Elementos a constar do relatório do ensaio:

Produto químico em estudo:

Substância monocomponente

- aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas relevantes;
- dados de identificação química, como denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou código InChI, fórmula estrutural, grau de pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc. (incluindo teor de carbono orgânico, se for caso disso).

Substância multicomponentes, UVCB e misturas

- caracterização, tanto quanto possível, por exemplo: pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Espécie utilizada no ensaio:

- nome científico, estirpe, origem e método de recolha e de manipulação dos ovos fertilizados.

Condições de realização do ensaio:

- protocolo de ensaio utilizado (por exemplo: semiestático ou de fluxo contínuo, carga);
- fotoperíodo(s);
- planeamento do ensaio — por exemplo: número de cubas de ensaio e de replicados, número de ovos por replicado, material e dimensão das cubas de ensaio (altura, largura, volume), volume de água por cuba;
- método de preparação das soluções de reserva e frequência de renovação (indicar o agente de solubilização e a sua concentração, quando utilizado);
- método de dosagem do produto químico em estudo (por exemplo: bombas, sistemas de diluição);
- eficiência de recuperação do método e valores nominais das concentrações de ensaio, limite de quantificação, médias dos valores medidos e respetivos desvios-padrão nas cubas de ensaio e o método de obtenção desses desvios e médias, bem como elementos comprovativos de que as medições correspondem às concentrações do produto químico em estudo na verdadeira solução;
- características da água de diluição: pH, dureza, temperatura, concentração do oxigénio dissolvido, níveis de cloro residual (caso tenham sido medidos), carbono orgânico total (idem), sólidos em suspensão (idem), salinidade do meio de ensaio (idem) e quaisquer outras medições efetuadas;
- qualidade da água nas cubas de ensaio (pH, dureza, temperatura e concentração do oxigénio dissolvido);
- informações pormenorizadas sobre a alimentação (por exemplo: tipo de alimento(s), proveniência, quantidade fornecida e frequência).

Resultados individualizados (ou por replicado) e sob a forma de média e coeficiente de variação, consoante o caso, para os seguintes parâmetros:

- prova de que o grupo de controlo satisfaz o critério de aceitação estabelecido para a sobrevivência global da espécie estudada (apêndice 2);
- dados de mortalidade referentes a cada estágio (embrionário, larvar e juvenil) e mortalidade acumulada;
- dias decorridos até à eclosão, número de ovos eclodidos por dia e final da eclosão;
- número de peixes saudáveis no final do ensaio;
- dados de comprimento (indicar se normalizado ou total) e de peso dos animais sobreviventes;
- incidência, descrição e número das anomalias morfológicas eventualmente observadas;
- incidência, descrição e número dos efeitos comportamentais eventualmente observados;

- abordagem seguida na análise estatística (análise de regressão ou análise da variância) e no tratamento dos dados (modelo ou teste estatístico utilizado);
- concentração sem efeitos observáveis (NOEC) correspondente a cada resposta avaliada;
- menor concentração com efeitos observáveis (a $p=0,05$) (LOEC) correspondente a cada resposta avaliada;
- CE_x correspondente a cada resposta avaliada, se for o caso, e intervalos de confiança (90 % ou 95 %, por exemplo), gráfico do modelo ajustado utilizado para a calcular, declive da curva concentração-resposta, fórmula do modelo de regressão, estimativa dos parâmetros do modelo e erros-padrão correspondentes.

Desvios ao método de ensaio.

Discussão dos resultados, incluindo qualquer influência de desvios ao método de ensaio nos resultados do ensaio.

Quadro 1

Espécies de peixes recomendadas para os ensaios.

DE ÁGUA DOCE	ESTUARINAS OU MARINHAS
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Truta arco-íris	<i>Cyprinodon variegatus</i> Sargo-choupa
<i>Pimephales promelas</i> Vairão-de-cabeça-grande	<i>Menidia</i> sp. Peixe-rei
<i>Danio rerio</i> Peixe-zebra	
<i>Oryzias latipes</i> Peixe-do-arroz-japonês	

REFERÊNCIAS

- 1) OCDE (2012). Fish Toxicity Testing Framework. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 171. OCDE, Paris.
- 2) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 23. OCDE, Paris.
- 3) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88, 26 pp.
- 4) Brauhn, J.L., Schoettger, R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills. Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011. Duluth, Minnesota.
- 5) Brungs, W.A., Jones, B.R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. Ecological Research Series, EPA-600/3-77-061. Duluth, Minnesota.
- 6) Adolfsson-Erici *et al.* (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. *Chemosphere*, 86, 593-599.
- 7) Hutchinson, T.H., *et al.* (2006). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquatic Toxicology*, 76, 69-92.
- 8) Capítulo C.20 deste anexo: Ensaio de reprodução com *Daphnia magna*.

- 9) Hansen, D.J., Parrish, P.R. (1977). Suitability of sheepshead minnows (*Cyprindon variegatus*) for life-cycle toxicity tests, in *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (editado por Mayer, F.L., Hamelink, J.L.), ASTM STP 634.
 - 10) Kimmel, H.B., et al. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203:253–310.
 - 11) Gonzalez-Doncel, M., et al. (2005). A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthyidae). *Journal of Applied Ichthyology*, 20:1–14.
 - 12) Devlin, E.W., et al. (1996). Prehatching Development of the Fathead Minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C.
 - 13) Oris, J.T., Belanger, S.C., Bailer, A.J. (2012). Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31;2, 370–376.
 - 14) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. OCDE, Paris.
 - 15) Rao, J.N.K., Scott, A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, 48, 577–585.
 - 16) Rao, J.N.K., Scott, A.J. (1999). A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data. *Statistics in Medicine*, 18, 1373–1385.
 - 17) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of American Statistical Association*, 50, 1096–1121.
 - 18) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482–491.
 - 19) Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (1985). *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publication Corporation, Nova Iorque.
 - 20) McClave, J.T., Sullivan, J.H., Pearson, J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium. ASTM, Filadélfia.
-

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

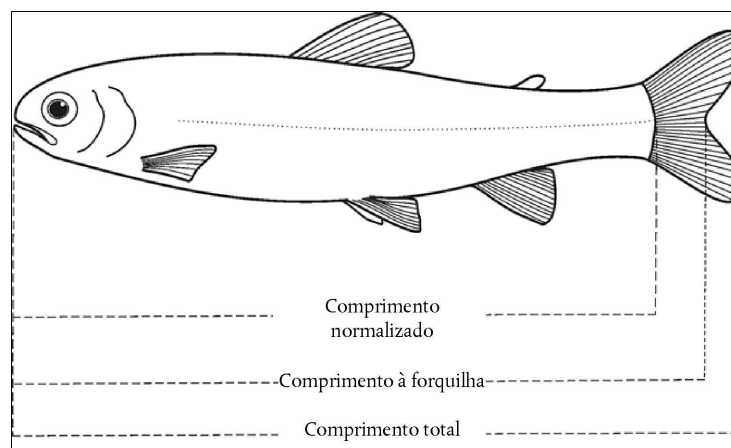
Comprimento à forquilha: comprimento entre a extremidade do focinho e a extremidade dos raios centrais da barbatana caudal; é utilizado nos peixes nos quais é difícil indicar onde termina a coluna vertebral (www.fishbase.org).

Comprimento normalizado: comprimento do peixe medido entre a extremidade do focinho e a extremidade posterior da última vértebra ou a extremidade posterior da parte lateral média da placa hipural. Ou seja, esta medida exclui o comprimento da barbatana caudal (www.fishbase.org).

Comprimento total: comprimento entre a extremidade do focinho e a extremidade do lobo mais longo da barbatana caudal, normalmente medido com os lobos espalmados no prolongamento da linha média; mede-se um segmento de reta, não a curva de contorno do corpo (www.fishbase.org).

Figura 1

Representação dos diversos comprimentos utilizados.



Produto químico: Substância ou mistura.

CE_x (concentração com efeitos em x %): concentração que causa efeitos em x % dos organismos sujeitos a ensaio num determinado período de exposição, comparativamente ao grupo de controlo. Por exemplo, a CE₅₀ é a concentração que causa efeitos, num parâmetro ensaiado, em 50 % da população exposta durante o período definido.

Menor concentração com efeitos observáveis (LOEC): menor concentração de ensaio do produto químico em estudo à qual este tem algum efeito com significância estatística ($p < 0,05$), comparativamente ao grupo de controlo. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter efeitos nocivos iguais ou superiores aos verificados à LOEC. Se não estiverem preenchidas estas duas condições, deve explicar-se como se escolheu a LOEC (e a NOEC). Os apêndices 5 e 6 contêm orientações neste domínio.

Concentração sem efeitos observáveis (NOEC): das concentrações ensaiadas, é a mais elevada imediatamente abaixo do LOEC que, comparativamente ao grupo de controlo, não tem nenhum efeito com significância estatística ($p < 0,05$), durante o período de exposição indicado.

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

UVCB: substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou matérias biológicas.

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada.

SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*): Especificação de escrita molecular linear simplificada.

CONDIÇÕES DE REALIZAÇÃO E DURAÇÃO DO ENSAIO E CRITÉRIOS DE SOBREVIVÊNCIA PARA AS ESPÉCIES RECOMENDADAS

ESPÉCIE	CONDIÇÕES DE REALIZAÇÃO DO ENSAIO			DURAÇÃO RECOMENDADA DO ENSAIO	Valor médio mínimo normal do comprimento total dos peixes de controlo no final do estudo (mm) ⁽¹⁾	TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DOS PEIXES DE CONTROLO (% mínima)	
	Temperatura (°C)	Salinidade (‰)	Fotoperíodo (horas)			Na eclosão	Após a eclosão
De água doce:							
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Truta arco-íris	10 ± 1,5 ⁽²⁾		12-16 ⁽³⁾	duas semanas após o início da alimentação livre dos peixes de controlo (ou 60 dias, a contar da eclosão)	40	75 %	75 %
<i>Pimephales promelas</i> Vairão-de-cabeça-grande	25 ± 1,5		16	32 dias, a contar do início do ensaio (ou 28 dias, a contar da eclosão)	18	70 %	75 %
<i>Danio rerio</i> Peixe-zebra	26 ± 1,5		12-16 ⁽⁴⁾	30 dias, a contar da eclosão	11	70 %	75 %
<i>Oryzias latipes</i> Peixe-do-arroz-japonês	25 ± 2		12-16 ⁽⁴⁾	30 dias, a contar da eclosão	17	80 %	80 %
Estuarina ou marinha:							
<i>Cyprinodon variegatus</i> Sargo-choupa	25 ± 1,5	15-35 ⁽⁵⁾	12-16 ⁽⁴⁾	32 dias, a contar do início do ensaio (ou 28 dias, a contar da eclosão)	17	75 %	80 %
<i>Menidia sp.</i> Peixe-rei	22-25	15-35 ⁽⁵⁾	13	28 dias	20	80 %	60 %

Legenda:

- ⁽¹⁾ O valor médio mínimo normal do comprimento total não constitui critério de validade, mas médias inferiores ao valor indicado devem ser cuidadosamente examinadas em termos de sensibilidade do ensaio. Determinaram-se os valores médios mínimos de comprimento total a partir de uma seleção de dados disponíveis.
- ⁽²⁾ A estirpe de truta arco-íris utilizada no ensaio pode exigir outras temperaturas. Os peixes reprodutores devem estar à mesma temperatura que os ovos. Se os ovos provierem de um criador comercial, é necessária uma curta adaptação (1-2 h) à temperatura do ensaio.
- ⁽³⁾ Durante a semana seguinte à eclosão, as larvas devem ser mantidas na obscuridade, exceto quando estiverem a ser examinadas; em seguida, mantêm-se sob iluminação coada durante o resto do ensaio (fotoperíodo de 12 a 16 horas) ⁽⁴⁾.
- ⁽⁴⁾ O programa de iluminação deve ser constante, independentemente das condições de realização do ensaio.
- ⁽⁵⁾ O desvio admissível em qualquer ensaio é de $\pm 2\%$.

ORIENTAÇÕES RELATIVAS À ALIMENTAÇÃO E À MANIPULAÇÃO DOS PEIXES REPRODUTORES E DOS PEIXES UTILIZADOS NO ENSAIO, DAS ESPÉCIES RECOMENDADAS

ESPÉCIE	ALIMENTAÇÃO (*)				MOMENTO DA TRANSFERÊNCIA, APÓS A ECLOSÃO	MOMENTO DO PRIMEIRO FORNECIMENTO DE ALIMENTOS
	Peixes reprodutores	Larvas recém-eclodidas	Juvenis			
			Tipo	Frequência		
De água doce:						
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Truta arco-íris	alimento para trutas	nenhuma ^(a)	alimento inicial para trutas, NA	2-4 vezes por dia	14-16 dias após a eclosão ou quando da ascensão (facultativo)	19 dias após a eclosão ou quando da ascensão
<i>Pimephales promelas</i> Vairão-de-cabeça-grande	NA, alimento floculado, AC	NA	NA48, alimento floculado	2-3 vezes por dia	após eclosão de 90 %	2 dias após a eclosão
<i>Danio rerio</i> Peixe-zebra	NA, alimento floculado	alimento comercial para larvas, protozoários ^(b) , proteínas ^(c)	NA48, alimento floculado	NA uma vez por dia; alimento floculado duas vezes por dia	após eclosão de 90 %	2 dias após a eclosão
<i>Oryzias latipes</i> Peixe-do-arroz-japonês	alimento floculado	NA, alimento floculado (ou protozoários ou rotíferos)	NA48, alimento floculado (ou rotíferos)	NA uma vez por dia; alimento floculado duas vezes por dia <u>ou</u> alimento floculado e rotíferos uma vez por dia	inaplicável	6-7 dias após a eclosão
Estuarina ou marinha:						
<i>Cyprinodon variegatus</i> Sargo-choupa	NA, alimento floculado, AC	NA	NA48	2-3 vezes por dia	inaplicável	1 dia após a eclosão/ascensão
<i>Menidia sp.</i> Peixe-rei	NA48, alimento floculado	NA	NA48	2-3 vezes por dia	inaplicável	1 dia após a eclosão/ascensão

Legenda:

(*) Alimentação a fornecer *ad libitum*. Para evitar a acumulação de resíduos, removem-se, sempre que necessário, o excesso de alimento e as fezes.

AC: Artémias congeladas; adultos de espécies do género *Artemia*.

NA: Náuplios de artémias; recém-eclodidos.

NA48: Náuplios de artémias; com 48 horas.

^(a) As larvas com saco vitelino não necessitam de ser alimentadas.

^(b) Filtrados de uma cultura mista.

^(c) Grânulos de processo fermentativo.

Apêndice 4

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

Componente	Limite de concentração
Partículas	5 mg/l
Carbono orgânico total	2 mg/l
Amoníaco não-ionizado	1 µg/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
Alumínio	1 µg/l
Arsénio	1 µg/l
Crómio	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Cobre	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
Chumbo	1 µg/l
Níquel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cádmio	100 ng/l
Mercúrio	100 ng/l
Prata	100 ng/l

Apêndice 5

ORIENTAÇÕES ESTATÍSTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DA NOEC

Aspetos gerais

Cada cuba replicada constitui uma unidade de análise. Por conseguinte, no caso das medições contínuas, como o tamanho, calcula-se a média ou a mediana de cada replicado, sendo estes os dados a analisar. É necessário demonstrar a representatividade estatística dos testes utilizados, de preferência com fundamento numa base de dados histórica adequada do laboratório. Para cada parâmetro, devem ser indicados o teste estatístico a utilizar e a variação (mínima) de tamanho detetável com 75-80 % de representatividade estatística.

As bases de dados disponíveis aquando da elaboração deste método de ensaio definem a representatividade estatística associável aos métodos estatísticos recomendados. O laboratório deve demonstrar-se capaz de satisfazer o requisito de representatividade estatística mediante a realização de uma análise de representatividade estatística ou comprovando que o coeficiente de variação de cada resposta não vai além do 90.º percentil dos coeficientes de variação utilizados na elaboração do *Test Guideline*, indicados no quadro 1. Caso se disponha apenas de médias ou medianas por replicado, pode ignorar-se o coeficiente de variação nos replicados.

Quadro 1

90.º percentil de coeficientes de variação para espécies de água doce escolhidas.

Espécie	Resposta	Coeficiente de variação entre replicados	Coeficiente de variação nos replicados
Truta arco-íris	Comprimento	17,4	9,8
	Peso	10,1	28
Vairão-de-cabeça-grande	Comprimento	16,9	13,5
	Peso	11,7	38,7
Peixe-zebra	Comprimento	43,7	11,7
	Peso	11,9	32,8

No caso de praticamente todos os testes estatísticos para avaliar estudos toxicológicos realizados em laboratório, as comparações relevantes são entre os grupos expostos e os grupos de controlo. Não se justifica, portanto, exigir um teste F de significância (análise de variância) antes de realizar um teste de Dunnett ou um teste de Williams nem um teste de significância de Kruskal-Wallis antes de realizar um teste de Jonckheere-Terpstra, Mann-Whitney ou Dunn (Hochberg e Tamhane, 1987; Hsu, 1996; Dunnett, 1955, 1964; Williams, 1971, 1972, 1975, 1977; Robertson *et al.*, 1988; Jonckheere, 1954; Dunn, 1964).

O teste de Dunnett permite comparações múltiplas e a utilização de um teste F como filtro prejudica as suas taxas de falsos positivos e de falsos negativos. Analogamente, os testes regressivos de Williams e de Jonckheere-Terpstra com nível de significância de 0,05 em cada etapa mantêm uma taxa global de falsos positivos de 5 %, sendo que esta e a representatividade estatística dos testes são prejudicadas pela utilização, como filtro, do teste F ou do teste de Kruskal-Wallis. O teste de Mann-Whitney e o teste de Dunn têm de ser adaptados para comparações múltiplas, aconselhando-se o ajustamento de Bonferroni-Holm.

A referência «OCDE (2006)» contém vasta bibliografia e um exame aprofundado da maior parte das recomendações sobre testes de hipóteses e sobre a verificação dos pressupostos que lhes estão subjacentes.

Tratamento dos grupos de controlo quando se utiliza solvente

Caso se utilize um solvente, é necessário prever um grupo de controlo da água de diluição e um grupo de controlo do solvente. Comparam-se a resposta obtida para o primeiro com a resposta obtida para o segundo; se não apresentarem diferenças com significância estatística, combinam-se um com o outro na análise estatística. Caso contrário, utiliza-se o grupo de controlo do solvente na determinação da NOEC ou na estimativa da CE_x , mas não o grupo de controlo da água de diluição. Ver a restrição enunciada nos critérios de validade (ponto 7).

Para o comprimento, o peso, a proporção de ovos eclodidos, a taxa de mortalidade larvar ou de larvas anormais e o primeiro ou último dia de eclosão ou de ascensão, deve utilizar-se um teste T ou um teste de Mann-Whitney para comparar o grupo de controlo da água de diluição com o grupo de controlo do solvente ao nível de significância de 0,05, ignorando todos os grupos expostos. Os resultados destes testes devem constar do relatório.

Medições relacionadas com o tamanho (comprimento e peso)

O comprimento e o peso dos peixes podem seguir uma distribuição normal ou log-normal. Em qualquer dos casos, o teorema do limite central prevê que os valores médios por replicado tendem para uma distribuição normal, o que é corroborado pelos resultados de mais de 100 estudos nos primeiros estádios de vida realizados em três espécies de água doce. Em alternativa, se os dados ou as bases de dados históricas apontarem para uma distribuição log-normal dos valores relacionados com o tamanho dos peixes, pode calcular-se o logaritmo da média dos valores correspondentes aos peixes que constituem cada replicado, tomando depois como dados a analisar os antilogaritmos desses logaritmos de médias por replicado.

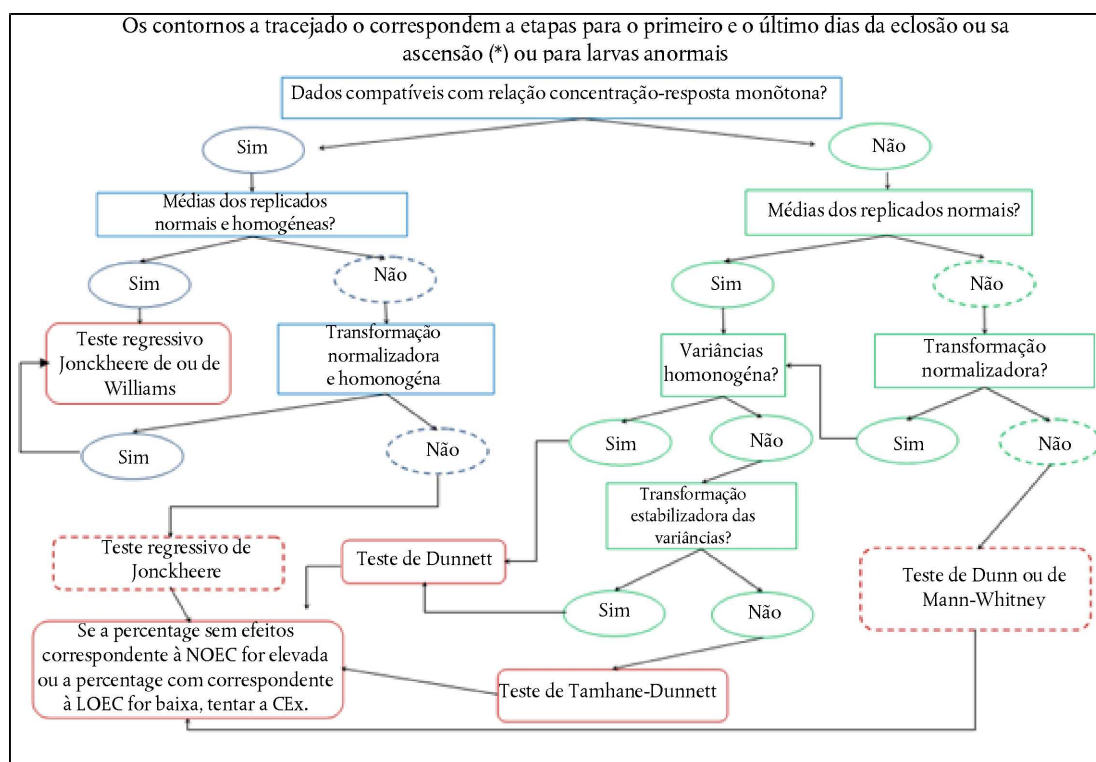
Deve avaliar-se a compatibilidade dos dados com uma distribuição normal e com uma variância homogénea. Para o efeito, devem ser utilizados os resíduos de um modelo ANOVA em que a concentração seja a única variável explicativa. Pode recorrer-se a diagramas de dispersão, histogramas ou diagramas de caule e folha («*stem-and-leaf plots*»). Em alternativa, pode utilizar-se um teste formal, como o teste de Shapiro-Wilk ou o teste de Anderson-Darling. Pode avaliar-se a compatibilidade com uma variância homogénea através de um exame visual do mesmo diagrama de dispersão ou, formalmente, por meio de um teste de Levene. A verificação da normalidade e da homogeneidade da variância só é necessária no caso dos testes paramétricos (teste de Williams ou teste de Dunnett, por exemplo).

É necessário estar atento a eventuais valores aberrantes e às implicações destes na análise. Pode recorrer-se ao teste de valores aberrantes de Tukey e ao exame visual dos já referidos diagramas de resíduos. Lembra-se que a observação corresponde ao replicado completo, pelo que a exclusão de valores aberrantes da análise carece de cuidadosa ponderação.

Os testes estatísticos assentes nas características do protocolo experimental e nas expectativas biológicas são testes de tendência regressivos, como o de Williams ou o de Jonckheere-Terpstra. Estes testes pressupõem uma relação concentração-resposta monótona, pelo que há que avaliar a compatibilidade dos dados com este pressuposto. A avaliação pode ser por exame visual do diagrama de dispersão das médias por replicado, em função da concentração ensaiada. Será útil sobrepor a esse diagrama um diagrama linear por segmentos que ligue as médias de concentração, ponderadas em função da dimensão da amostra colhida do replicado. Se esse diagrama por segmentos se desviar muito de um traçado monótono, poderá ser necessário recorrer a testes que não sejam de tendência. Em alternativa, pode recorrer-se a testes formais. Um teste formal simples passa por calcular os contrastes lineares e quadráticos das médias de concentração. Se o contraste quadrático tiver significância e o contraste linear não a tiver, poderá haver um problema de monotonia, a reavaliar com base nos ditos diagramas. Caso haja dúvidas quanto à normalidade ou à homogeneidade da variância, os referidos contrastes podem ser construídos a partir de dados resultantes de uma transformação de ordenamento. Podem ser utilizados outros métodos, como o teste de monotonia de Bartholomew, mas com aumento de complexidade.

Figura 2

Fluxograma para determinar a NOEC com base em medições relacionadas com o tamanho (comprimento e peso).



(*) Estas respostas nunca satisfazem os pressupostos de modelos ou análises paramétricos.

A menos que os dados não sejam compatíveis com os requisitos desses testes, determina-se a NOEC por aplicação regressiva do teste de Williams ou do teste de Jonckheere-Terpstra. A referência «OCDE (2006)» fornece mais elementos sobre a aplicação destes métodos. Se os dados não forem compatíveis com os requisitos de um teste de tendência regressiva, pode utilizar-se o teste de Dunnett ou o teste de Tamhane-Dunnett (T3), ambos com possibilidade de comparações múltiplas. Estes testes pressupõem uma distribuição normal e, no caso do teste de Dunnett, homogeneidade da variância. Se estas condições não forem satisfeitas, pode recorrer-se ao teste não-paramétrico de Dunn. A referência «OCDE (2006)» fornece mais elementos sobre todos estes testes. A figura 2 explica, em linhas gerais, como se pode escolher o teste adequado.

Eclosão, sobrevivência das larvas

Os dados a analisar são as proporções de ovos que eclodem ou de larvas que sobrevivem em cada replicado. Estas proporções devem ser avaliadas em termos de variância extrabinomial, que é frequente, mas não universal, nestes dois casos. O fluxograma da figura 3 constitui uma orientação para a escolha do teste adequado; completa-o o texto explicativo.

São dois os testes normalmente utilizados: o teste $C(\alpha)$ de Tarone (Tarone, 1979) e os testes de chi-quadrado, cada um deles aplicado separadamente a cada concentração de ensaio. Caso se observe variância extrabinomial, ainda que apenas numa concentração de ensaio, devem utilizar-se métodos que a contemplem.

Fórmula 1

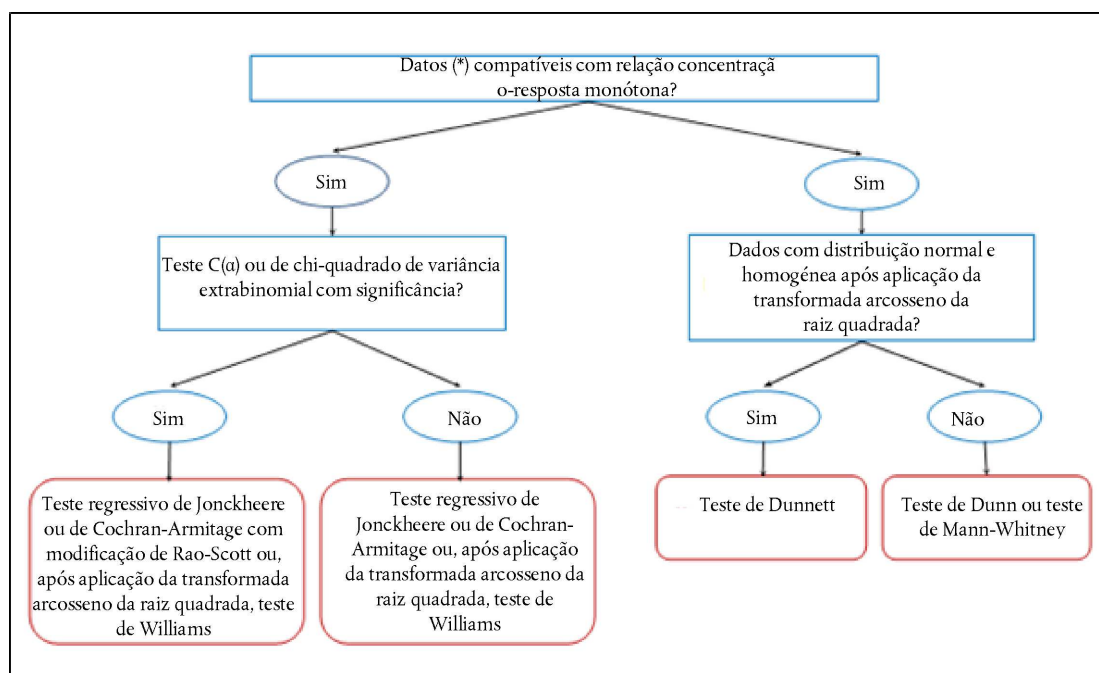
Teste $C(\alpha)$ de Tarone (Tarone, 1979).

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^m \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1 - \hat{p})} - \sum_{j=1}^m n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^m n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

em que $\hat{p}$ é a proporção média correspondente a uma determinada concentração, m é o número de cubas replicadas, n_j é o número de sujeitos presentes no replicado j e x_j é o número de sujeitos respondentes nesse replicado, isto é, os casos de não-eclosão ou de morte no replicado. Aplica-se este teste separadamente a cada concentração. Pode considerar-se um teste de chi-quadrado corrigido, mas um certo número de simulações de representatividade estatística efetuadas por Tarone mostraram ser um teste mais poderoso que um teste de chi-quadrado.

Figura 3

Fluxograma para determinar a NOEC com base na eclosão dos ovos e na mortalidade larvar.



(*) Os dados a analisar são as proporções por replicado.

Caso não haja indícios significativos de variância extrabinomial, pode utilizar-se o teste regressivo de Cochran-Armitage. Uma vez que este ignora os replicados, recomenda-se que, caso haja indícios significativos de variância extrabinomial, lhe seja aplicada a correção de Rao-Scott, que tem em conta os replicados, a dimensão destes e a variância extrabinomial. Outras possibilidades são os testes regressivos de Williams e de Jonckheere-Terpstra, bem como o teste de Dunnett, conforme referido no item «Medições relacionadas com o tamanho». Estes testes podem ser utilizados caso exista variância extrabinomial ou não, mas a sua representatividade estatística é menor (Agresti, 2002; Morgan, 1992; Rao e Scott, 1992, 1999; Fung *et al.*, 1994, 1996).

Primeiro ou último dia de eclosão e ascensão

A resposta a analisar é um número inteiro, correspondente ao dia do ensaio no qual a observação indicada é feita na cuba replicada em causa. Em geral, a gama de valores é muito limitada e são frequentes proporções elevadas de valores ligados (por exemplo, observação do mesmo primeiro dia de eclosão em todos os replicados de controlo e, possivelmente, também na concentração mais baixa ou nas duas concentrações mais baixas). Testes paramétricos, como o de Williams ou o de Dunnett, não se adequam a este tipo de dados. A menos que haja indícios de acentuada não-monotonia, o teste regressivo de Jonckheere-Terpstra é muito poderoso na deteção de efeitos de produtos químicos. Caso contrário, pode utilizar-se o teste de Dunn.

Larvas com anomalias

A resposta a analisar é o número de larvas em que foi detetada alguma anomalia. Esta resposta tem uma incidência muitas vezes baixa e estão-lhe associados os mesmos problemas que ao primeiro dia de eclosão, bem como, por vezes, uma relação concentração-resposta errática. Se os dados se relacionarem segundo uma função aproximadamente monótona da concentração, o teste regressivo de Jonckheere-Terpstra é poderoso na deteção de efeitos. Caso contrário, pode utilizar-se o teste de Dunn.

REFERÊNCIAS

Agresti, A. (2002). *Categorical Data Analysis*, segunda edição. Wiley, Hoboken.

Dunnnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. American Statistical Association*, 50, 1096-1121.

Dunn O.J. (1964). Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics*, 6, 241-252.

Dunnnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.

Fung, K.Y., Krewski, D., Rao, J.N.K., Scott, A.J. (1994). Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data. *Risk Analysis*, 14, 639-648.

Fung, K.Y, Krewski, D., Smythe, R.T. (1996). A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay. *Canadian Journal of Statistics*, 24, 431-454.

Hochberg, Y., Tamhane, A.C. (1987). *Multiple Comparison Procedures*. Wiley, Nova Iorque.

Hsu, J.C. (1996). *Multiple Comparisons: Theory and Methods*. Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere, A.R. (1954). A distribution-free k-sample test against ordered alternatives. *Biometrika*, 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992). *Analysis of Quantal Response Data*. Chapman and Hall, Londres.

OCDE (2006). *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos (OCDE), Paris.

Rao J.N.K., Scott, A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, 48, 577-585.

Rao J.N.K., Scott, A.J. (1999). A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data. *Statistics in Medicine*, 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright, F.T., Dykstra, R.L. (1988). *Order restricted statistical inference*. Wiley.

Tarone, R.E. (1979). Testing the goodness of fit of the Binomial distribution. *Biometrika*, 66, 585-590.

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.

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28, 519-531.

Williams, D.A. (1975). The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratology. *Biometrics*, 31, 949-952.

Williams, D.A. (1977). Some inference procedures for monotonically ordered normal means. *Biometrika*, 64, 9-14.

Apêndice 6

ORIENTAÇÕES ESTATÍSTICAS PARA AS ESTIMATIVAS POR REGRESSÃO

Aspetos gerais

As observações às quais se ajusta um modelo são as médias (de comprimento e de peso) por replicado ou as proporções (de eclosão dos ovos e de mortalidade larvar) por replicado (OCDE, 2006).

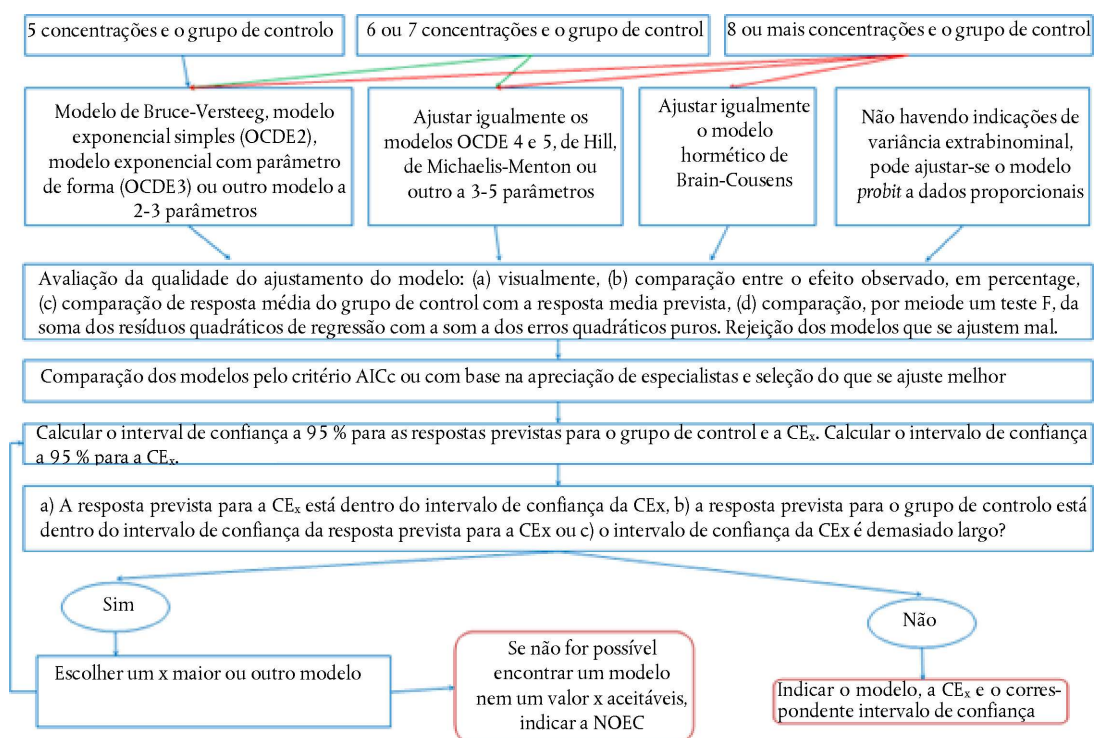
Recomenda-se, em geral, uma regressão ponderada, utilizando como fator de ponderação a dimensão da amostra do replicado. Há outras possibilidades de ponderação; por exemplo: utilizando como fator de ponderação a resposta média prevista ou uma combinação desta e da dimensão da amostra do replicado. Não se recomenda a ponderação por meio do inverso da variância das amostras a cada concentração (Bunke *et al.*, 1999; Seber e Wild, 2003; Motulsky e Christopoulos, 2004; Huet *et al.*, 2003).

Qualquer transformação das respostas antes da análise estatística deve manter a independência das observações; além disso, a CE_x e os limites do intervalo de confiança desta devem ser expressos nas unidades de medida originais e não em unidades transformadas. Por exemplo, uma variação de 20 % do logaritmo do comprimento não equivale a uma variação de 20 % do comprimento (Lyles *et al.*, 2008; Draper e Smith, 1999).

O fluxograma da figura 4 resume como proceder a estimativas de CE_x . Completam-no as explicações dadas no texto.

Figura 4

Fluxograma para estimativa da CE_x em função das médias por replicado de comprimento, peso ou proporção de eclosão dos ovos ou de mortalidade larvar (mais pormenores no texto).



Considerações relativas à eclosão dos ovos e à mortalidade larvar

Para a eclosão dos ovos e a mortalidade larvar, é geralmente preferível ajustar um modelo decrescente, a menos que se pretenda ajustar um modelo *probit* como se descreve a seguir. Ou seja, deve ajustar-se o modelo à proporção de ovos não-eclodidos ou de larvas mortas. A razão disto é que a CE_x se refere à concentração à qual se verifica uma variação de x % em relação à resposta média do grupo de controlo. Se 5 % dos ovos do grupo de controlo não eclodirem e o modelo traduzir a não-eclosão, a CE_{20} corresponderá à concentração à qual ocorrerá uma variação de 20 % da proporção de 5 % de ovos não-eclodidos no grupo de controlo, ou seja, uma variação de $0,2 \times 0,05 = 0,01$, o que representa um aumento de um ponto percentual, para 6 % de não-eclosões. Uma variação tão pequena não pode ser estimada de modo significativo a partir dos dados disponíveis e não tem relevância biológica. Em contrapartida, se o modelo traduzir a proporção de ovos eclodidos, a proporção correspondente ao grupo de controlo será, neste exemplo, de 95 %, e uma redução de 20 % em relação à média do grupo de controlo equivaleria a uma variação de $0,95 \times 0,2 = 0,18$, ou seja, uma variação do êxito da eclosão de 95 % para 77 % ($= 95 - 18$), podendo estimar-se a concentração que gera este efeito, previsivelmente de maior interesse. O problema não se coloca com as medições relacionadas com o tamanho; efeitos adversos no tamanho traduzem-se geralmente numa diminuição deste.

Modelos aplicáveis ao tamanho (comprimento ou peso) e ao êxito da eclosão dos ovos ou à sobrevivência larvar

Com exceção do modelo hormético de Brain-Cousens, todos estes modelos são descritos e recomendados na referência «OCDE (2006)». Discutem-se igualmente os modelos OCDE 2 a 5 para experiências de ecotoxicidade em Slob (2002). Há, evidentemente, muitos outros modelos que poderão ser úteis. Bunke *et al.* (1999) enumeram uma vasta série de modelos que não são aqui referidos, e há numerosas referências a outros modelos. Os modelos a seguir referidos são considerados especialmente adequados para experiências de ecotoxicidade e amplamente utilizados.

5 concentrações de ensaio e grupo de controlo

- modelo de Bruce-Versteeg;
- modelo exponencial simples (OCDE 2);
- modelo exponencial com parâmetro de forma (OCDE 3);
- modelo exponencial simples com limite inferior (OCDE 4).

6 ou mais concentrações de ensaio e grupo de controlo

- modelo exponencial com parâmetro de forma e limite inferior (OCDE 5);
- modelo de Michaelis-Menten;
- modelo de Hill.

Caso exista prova visual de hormese (improvável no caso da eclosão dos ovos ou da sobrevivência larvar, mas por vezes evidenciada nas observações relacionadas com o tamanho):

- modelo hormético de Brain-Cousens — Brain e Cousens (1989).

Modelos alternativos para a não-eclosão dos ovos e a mortalidade larvar

- Caso não haja indícios de variância extrabinomial, podem ser ajustados a estas respostas modelos crescentes *probit* (ou logísticos), sendo a incidência no grupo de controlo estimada no ajustamento do modelo. Não é este o método a privilegiar, por considerar que a unidade de análise é, não o replicado, mas o indivíduo (Morgan, 1992; O'Hara Hines e Lawless, 1993; Collett, 2002, 2003).

Qualidade do ajustamento de um modelo

- Comparação visual do decréscimo percentual, observado e previsto, correspondente a cada concentração ensaiada (Morgan, 1992; O'Hara Hines e Lawless, 1993; Collett, 2002, 2003).

- Comparação, por meio de um teste F, do erro quadrático médio de regressão com o erro quadrático médio puro (Draper e Smith, 1999).
- Verificação de que cada termo do modelo se distingue, com significância, de zero (ou seja, determinação da importância de todos os termos do modelo) (Motulsky e Christopoulos, 2004).
- Representação gráfica dos resíduos da regressão em função da concentração de ensaio, recorrendo eventualmente a uma escala logarítmica da concentração. Esta representação não deve definir nenhum padrão; os pontos devem estar dispersos de modo aleatório segundo uma linha horizontal à altura zero.
- Avaliação da normalidade da distribuição e da homogeneidade da variância dos dados como se indicou no apêndice 5.
- Em acréscimo, avaliação da normalidade da distribuição dos resíduos do modelo de regressão, pelos métodos indicados no apêndice 5 para os resíduos de um modelo ANOVA.

Comparação de modelos

- Utilização dos critérios AICc de Akaike. Valores AICc menores traduzem melhores ajustamentos; se $AICc(B) - AICc(A) \geq 10$, o modelo A é quase seguramente melhor do que o modelo B (Motulsky e Christopoulos, 2004);
- Comparação visual dos dois modelos quanto à satisfação dos critérios acima indicados para um modelo;
- Aplicação recomendada do princípio da parcimónia, segundo o qual se deve utilizar o modelo mais simples que se ajuste razoavelmente aos dados (Ratkowsky, 1993; Lyles *et al.*, 2008).

Qualidade da estimativa de CE_x

O intervalo de confiança da CE_x não deve ser demasiado amplo. É necessário ajuizar, em termos estatísticos, que amplitude máxima pode ter o intervalo de confiança para que a CE_x tenha utilidade. Simulações do ajustamento de modelos de regressão a dados de eclosão dos ovos e a dados relacionados com o tamanho mostram que a amplitude de cerca de 75 % dos intervalos de confiança de CE_x ($x = 10, 20$ ou 30) não excede duas concentrações de ensaio. Esta conclusão constitui uma orientação geral de aceitabilidade e dá uma ideia do que é realizável. Numerosos autores vinculam a necessidade de dar conta dos intervalos de confiança de todos os parâmetros do modelo e afirmam que parâmetros do modelo com intervalos de confiança largos são indicadores da inaceitabilidade do modelo (Ott e Longnecker, 2008; Alvord e Rossio, 1993; Motulsky e Christopoulos, 2004; Lyles *et al.*, 2008; Seber e Wild, 2003; Bunke *et al.*, 1999; Environment Canada, 2005).

O intervalo de confiança correspondente à CE_x (ou a qualquer outro parâmetro do modelo) não deve compreender o valor zero (Motulsky e Christopoulos, 2004). Trata-se do equivalente, na regressão, da diferença mínima com significância frequentemente referida nos métodos de teste de hipóteses (por exemplo: Wang *et al.*, 2000). Corresponde igualmente a que o intervalo de confiança das respostas médias à LOEC não compreenda a média do grupo de controlo. Importa refletir sobre a plausibilidade científica das estimativas dos parâmetros. Por exemplo, se o intervalo de confiança correspondente a y_0 for ± 20 %, nenhuma estimativa de CE_{10} será plausível. Se o modelo prever um efeito a 20 % à concentração C e o efeito máximo observado a essa concentração e a concentrações inferiores for 10 %, a CE_{20} não será plausível (Motulsky e Christopoulos, 2004; Wang *et al.*, 2000; Environment Canada, 2005).

A CE_x não é extrapolável para concentrações que não sejam positivas [Draper e Smith, 1999; OCDE (2006)]. Por exemplo, uma orientação geral poderá ser que a CE_x não seja inferior em mais de 25 % à menor das concentrações ensaiadas nem superior em mais de 25 % à maior destas.

REFERÊNCIAS

- Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993). Determining confidence limits for drug potency in immunoassay. *Journal of Immunological Methods*, 157, 155-163.
- Brain, P., Cousens, R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed res.*, 29:93-96.

- Bunke, O., Droge, B., Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics*, 33, 197-240.
- Collett, D. (2002). *Modelling Binary Data*, segunda edição. Chapman and Hall, Londres.
- Collett, D. (2003). *Modelling Survival Data in Medical Research*, segunda edição. Chapman and Hall, Londres.
- Draper, N.R., Smith, H. (1999). *Applied Regression Analysis*, terceira edição. John Wiley & Sons, Nova Iorque.
- Environment Canada (2005). *Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests*. Report EPS 1/RM/46.
- Huet, S., Bouvier, A., Poursat, M.-A., Jolivet, E. (2003). *Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples*. Springer Series in Statistics, Nova Iorque.
- Lyles, R.H., Poindexter, C., Evans, A., Brown, M., Cooper, C.R. (2008). Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data. *Contemp. Clin. Trials*, novembro de 2008, 29 (6):878–886.
- Morgan, B.J.T. (1992). *Analysis of Quantal Response Data*. Chapman and Hall, Londres.
- Motulsky, H., Christopoulos, A. (2004). *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*. Oxford University Press, E.U.A.
- O'Hara Hines, R.J., Lawless, J.F. (1993). Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time. *Biometrics*, vol. 49, pp. 107-121.
- OCDE (2006). *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*. Series Testing and Assessment, No. 54. Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos (OCDE), Paris.
- Ott, R.L., Longnecker, M.T (2008). *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis* — sexta edição. Brooks-Cole, Belmont, CA.
- Ratkowsky, D.A. (1993). Principles of nonlinear regression. *Journal of Industrial Microbiology*, 12, 195-199.
- Seber, G.A.F., Wild, C.J. (2003). *Nonlinear Regression*. Wiley.
- Slob, W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66, 298-312.
- Wang, Q., Denton, D.L., Shukla, R. (2000). Applications and Statistical Properties of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing in a Toxicity Testing Program. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 19, pp. 113–117, 2000.
-

C.48 Ensaio curto de efeitos na reprodução em peixes**INTRODUÇÃO**

1. Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline 229* (2012) da OCDE. A necessidade de desenvolver e validar um ensaio em peixes capaz de detetar produtos químicos com atividade endócrina decorre dos receios acerca da possibilidade de os níveis ambientais dos produtos químicos em causa terem efeitos indesejados nas populações humanas e na fauna e flora selvagens, devido a interações dos referidos produtos químicos com o sistema endócrino. Em 1998, a OCDE deu início a uma ação de elevada prioridade com vista a rever as orientações existentes e a elaborar novas orientações para despistagem e ensaio de potenciais desreguladores do sistema endócrino. Um dos elementos dessa ação foi a elaboração de um *Test Guideline* para a despistagem de produtos químicos com atividade no sistema endócrino de espécies ictiológicas. O Ensaio Curto de Efeitos na Reprodução em Peixes foi objeto de um vasto programa de validação, que consistiu em realizar estudos interlaboratoriais com determinados produtos químicos para demonstrar a pertinência e a fiabilidade do ensaio na deteção de produtos químicos que afetem a reprodução dos peixes por vários mecanismos, nomeadamente por via endócrina (1) (2) (3) (4) (5). Os parâmetros das referidas orientações da OCDE foram todos validados no vairão-de-cabeça-grande e parte deles no peixe-do-arroz-japonês (vitelogenina e caracteres sexuais secundários) e no peixe-zebra (vitelogenina). O trabalho de validação foi objeto de uma avaliação por pares no âmbito de um painel de peritos nomeados pelos coordenadores nacionais do programa de *Test Guidelines* da OCDE (6) e por um painel independente de peritos constituído por iniciativa da Agência de Proteção do Ambiente, dos E. U.A. Este ensaio não visa identificar mecanismos específicos de desregulação hormonal, pois os animais ensaiados possuem um eixo hipotálamo-hipófise-gónadas intacto e são passíveis de reagir (a diversos níveis) aos produtos químicos com efeitos nesse eixo.
2. Este método descreve um ensaio de despistagem *in vivo* que compreende a exposição, ao produto químico, de grupos mistos de machos sexualmente maduros e fêmeas reprodutoras, durante um período limitado (21 dias) do ciclo de vida dos peixes utilizados. Ao terminar o período de 21 dias de exposição, medem-se nos machos e fêmeas dois parâmetros biomarcadores indicativos de atividade endócrina do produto químico em estudo, designadamente a vitelogenina e caracteres sexuais secundários. Mede-se a vitelogenina no vairão-de-cabeça-grande, no peixe-do-arroz-japonês e no peixe-zebra; medem-se os caracteres sexuais secundários no vairão-de-cabeça-grande e no peixe-do-arroz-japonês. Durante o ensaio, monitoriza-se ainda, diariamente, a fecundidade em termos quantitativos. Conservam-se as gónadas e podem realizar-se exames histopatológicos para avaliar a aptidão reprodutiva dos animais em estudo e complementar os indícios extraídos de outros parâmetros.
3. Este bioensaio serve de ensaio de despistagem *in vivo* de efeitos na reprodução, enquadrando-se a sua aplicação no contexto do quadro conceptual da OCDE para ensaio e avaliação de produtos químicos desreguladores do sistema endócrino (30). Nesse quadro conceptual, o Ensaio Curto de Efeitos na Reprodução em Peixes inscreve-se no nível 3, enquanto ensaio *in vivo* que fornece dados acerca de um ou mais mecanismos/vias endócrinos determinados.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

4. As fêmeas de vertebrados ovíparos produzem normalmente vitelogenina (VTG) no fígado como reação aos estrogénios endógenos em circulação. Trata-se de um precursor das proteínas do vitelo que, uma vez produzido no fígado, é transportado pela corrente sanguínea até aos ovários, onde os ovócitos em desenvolvimento o absorvem e modificam. A vitelogenina é quase indetetável no plasma de peixes fêmeas imaturas e de peixes machos, que não têm estrogénios suficientes em circulação. Porém, o fígado é capaz de sintetizar e segregar vitelogenina como reação a uma estimulação estrogénica exógena.
5. A medição da vitelogenina serve para detetar produtos químicos com vários modos de ação estrogénica. É possível detetar produtos químicos estrogénicos medindo a indução de vitelogenina em peixes machos, método documentado em numerosas publicações científicas pré-avaliadas por especialistas — por exemplo (7). Também se demonstrou a indução de vitelogenina após exposição a androgénios aromatizáveis (8) (9). A diminuição do nível de estrogénios em circulação nas fêmeas (por exemplo: através da inibição da aromatase, que converte o androgénio endógeno no estrogénio natural 17 β -estradiol) provoca uma diminuição do nível de vitelogenina, efeito que é utilizado para detetar produtos químicos com propriedades inibidoras da aromatase (10) (11). As consequências biológicas de uma inibição estrogénica/da aromatase no nível de vitelogenina são um facto assente e estão amplamente documentadas. Todavia, a produção de vitelogenina nas fêmeas também pode ser afetada por toxicidade generalizada e por modos de ação tóxica não-endócrinos (por exemplo: hepatotoxicidade).

6. Desenvolveram-se e normalizaram-se com êxito vários métodos de medição para ensaios de rotina. É o caso dos métodos ELISA específicos para uma determinada espécie, que recorrem a processos imunológicos para quantificar a vitelogenina produzida em pequenas amostras hepáticas ou de sangue colhidas em peixes da espécie em causa (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18). Para a medição da vitelogenina, colhem-se/constituem-se amostras de sangue (vairão-de-cabeça-grande), de sangue ou de homogeneizado da cabeça e da cauda (peixe-zebra) ou do fígado (peixe-do-arroz-japonês). No peixe-do-arroz-japonês existe boa correlação entre a vitelogenina medida no sangue e no fígado (19). Descrevem-se no apêndice 6 os procedimentos recomendados para a colheita de amostras destinadas à análise da vitelogenina. É fácil encontrar kits para medição da vitelogenina, os quais, porém, devem basear-se num método ELISA validado para a espécie em causa.
7. Em determinadas espécies de peixes, os caracteres sexuais secundários dos machos são visíveis exteriormente, são quantificáveis e reagem aos níveis de androgénios endógenos em circulação. É o caso no vairão-de-cabeça-grande e no peixe-do-arroz-japonês, mas não no peixe-zebra, que não possui caracteres sexuais secundários quantificáveis. As fêmeas conservam a capacidade de desenvolver caracteres sexuais secundários masculinos quando expostas a produtos químicos androgénicos na água. Estão disponíveis na literatura científica vários estudos que documentam este tipo de resposta no vairão-de-cabeça-grande (20) e no peixe-do-arroz-japonês (21). Por razões de baixa representatividade estatística, um decréscimo dos caracteres sexuais secundários nos machos deve ser interpretado com precaução, com base na apreciação de especialistas na matéria e na ponderação da suficiência da prova. A utilização do peixe-zebra neste ensaio tem as suas limitações, por inexistência de caracteres sexuais secundários quantificáveis reativos a produtos químicos com atividade androgénica.
8. No vairão-de-cabeça-grande, o principal indicador de exposição a androgénios exógenos é o número de tubérculos nupciais existentes no focinho das fêmeas. No peixe-do-arroz-japonês, é o número de processos papilares que constitui o principal marcador da exposição exógena de fêmeas a produtos químicos androgénicos. Descrevem-se nos apêndices 5A e 5B os procedimentos recomendados para avaliar caracteres sexuais respetivamente no vairão-de-cabeça-grande e no peixe-do-arroz-japonês.
9. O ensaio a 21 dias em peixes compreende a determinação quantitativa da produção de ovos e a preservação das gónadas para exame histopatológico (facultativo). Algumas autoridades reguladoras podem exigir este parâmetro adicional para uma avaliação mais completa da aptidão reprodutiva dos animais em estudo ou nos casos em que os parâmetros «vitelogenina» e «caracteres sexuais secundários» não respondam à exposição ao produto químico. Embora determinados parâmetros tenham elevado valor de diagnóstico (indução de vitelogenina em machos e formação de tubérculos em fêmeas), nem todos os parâmetros contemplados no ensaio (fecundidade e histopatologia das gónadas) visam identificar inequivocamente um mecanismo específico de ação celular. Em vez disso, a série de parâmetros utilizada permite, no seu conjunto, tirar ilações acerca de eventuais perturbações endócrinas, que possam servir de orientação para ensaios complementares. Embora não seja afetada unicamente por perturbações endócrinas, a fecundidade constitui um parâmetro importante deste ensaio, dada a sua comprovada sensibilidade aos produtos químicos com atividade endócrina conhecida (5). Se a fecundidade e outros parâmetros não forem afetados, haverá mais razões para concluir pela improbabilidade de o composto em causa ter atividade endócrina. Porém, se a fecundidade for afetada, essa constatação influenciará fortemente as ilações extraíveis dos resultados obtidos. Na restante descrição deste método de ensaio estabelecem-se orientações sobre a interpretação dos dados e a aceitação de resultados experimentais.
10. No apêndice 1 definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

11. Expõem-se conjuntamente nas cubas de ensaio peixes machos e fêmeas em estágio reprodutor. Tratando-se de animais adultos reprodutores, é possível distinguir claramente um sexo do outro, o que possibilita uma análise de cada parâmetro em função do sexo, e garante-se a sensibilidade dos animais a produtos químicos exógenos. No final do ensaio, confirma-se o sexo por exame macroscópico das gónadas, após incisão abdominal com uma tesoura. O apêndice 2 recapitula as condições experimentais relevantes do bioensaio. Normalmente, inicia-se o ensaio com uma amostra de uma população de peixes capazes de procriar. Não se utilizam peixes senescentes. O ponto que aborda adiante a seleção dos peixes dá indicações sobre a idade dos peixes e o estado

reprodutivo destes. Realiza-se o ensaio com três concentrações de exposição ao produto químico em estudo, uma cuba de controlo da água e, se necessário, uma cuba de controlo do solvente. No caso do peixe-zebra, utilizam-se duas cubas (replicados) por concentração de exposição (contendo cada cuba cinco machos e cinco fêmeas). No caso do vairão-de-cabeça-grande, utilizam-se quatro cubas (replicados) por concentração de exposição (contendo cada cuba dois machos e quatro fêmeas). Tem-se, assim, em conta o comportamento territorial do vairão-de-cabeça-grande macho, garantindo concomitantemente suficiente representatividade estatística do ensaio. No caso do peixe-do-arroz-japonês, utilizam-se quatro cubas (replicados) por concentração de exposição (contendo cada cuba três machos e três fêmeas). A exposição prolonga-se por 21 dias, procedendo-se à colheita das amostras dos peixes ao vigésimo primeiro dia. Determina-se a fecundidade quantitativamente todos os dias.

12. Todos os peixes são eutanasiados no vigésimo primeiro dia. Medem-se os caracteres sexuais secundários no vairão-de-cabeça-grande e no peixe-do-arroz-japonês (ver os apêndices 5A e 5B). No caso do peixe-zebra e do vairão-de-cabeça-grande, colhem-se amostras de sangue para determinação da vitelogenina; no caso do peixe-zebra, podem colher-se, em alternativa, amostras da cabeça e da cauda, para determinação da vitelogenina no correspondente homogeneizado (apêndice 6). No caso do peixe-do-arroz-japonês, colhem-se amostras do fígado para a análise da vitelogenina (apêndice 6). As gónadas são fixadas *in situ* ou após dissecação, para eventual exame histopatológico (22).

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO DO ENSAIO

13. Para que os resultados do ensaio possam considerar-se aceitáveis, têm de se cumprir as seguintes condições:
- mortalidade nas cubas de controlo (água ou solvente), no final da exposição: não superior a 10 %;
 - concentração de oxigénio dissolvido ao longo do período de exposição: igual ou superior a 60 % do valor da saturação com ar (VSA);
 - diferença de temperatura da água entre as diversas cubas de ensaio: não superior a $\pm 1,5$ °C em qualquer momento do período de exposição, não se afastando a temperatura da água de cada cuba mais de 2 °C da temperatura especificada para a espécie utilizada no ensaio (apêndice 2);
 - existência de dados demonstrativos de que a concentração em solução do produto químico em estudo se manteve satisfatoriamente num intervalo de ± 20 % relativamente à média dos valores medidos;
 - existência de elementos comprovativos de que os peixes estão em desova em todos os replicados antes de se iniciar a exposição ao produto químico em estudo, bem como nos replicados de controlo durante o ensaio.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Material e aparelhagem

14. Equipamento normal de laboratório, designadamente o seguinte:
- a. Medidores de oxigénio e de pH;
 - b. Equipamento para determinação da alcalinidade e da dureza da água;
 - c. Aparelhagem apropriada para controlo da temperatura, de preferência com monitorização contínua;
 - d. Cubas de um material quimicamente inerte e de capacidade adequada à carga e à densidade de ocupação recomendadas (ver o apêndice 2);
 - e. Substrato de desova para o vairão-de-cabeça-grande e o peixe-zebra (ver os pormenores necessários no apêndice 4);
 - f. Balança de precisão apropriada (isto é, com uma aproximação de $\pm 0,5$ mg).

Água

15. Pode utilizar-se no ensaio qualquer água na qual a espécie em estudo apresente taxas adequadas de crescimento e de sobrevivência a longo prazo. A qualidade da água deve manter-se constante durante o ensaio. O pH da água deve situar-se entre 6,5 e 8,5, mas, durante um ensaio, não deve sofrer variações superiores a $\pm 0,5$ unidades de pH. Para assegurar que a água de diluição não influencia indevidamente os resultados do ensaio (por exemplo, por complexação do produto químico em estudo), devem ser colhidas regularmente amostras para análise. Deve determinar-se o teor de metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni etc.), dos principais aniões e catiões (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} etc.), de pesticidas (pesticidas organofosforados totais, pesticidas organoclorados totais etc.), de carbono orgânico total e de sólidos em suspensão. Se a qualidade da água de diluição se mantiver relativamente constante, estas medições podem realizar-se, por exemplo, de três em três meses. Caso a qualidade da água se tenha comprovadamente mantido inalterada durante, pelo menos, um ano, estas determinações podem ser menos frequentes (de seis em seis meses, por exemplo). No apêndice 3 apresentam-se algumas características químicas de uma água de diluição aceitável.

Soluções utilizadas no ensaio

16. Preparam-se as soluções a utilizar no ensaio por diluição de uma solução de reserva até às concentrações escolhidas. Preferencialmente, prepara-se a solução de reserva por simples mistura ou agitação do produto químico em estudo na água de diluição, utilizando meios mecânicos (agitação ou dispersão ultrassônica, por exemplo). Podem utilizar-se colunas de saturação (colunas de solubilidade) para obter soluções de reserva de concentração adequada. Não se recomenda a utilização de solventes, mas, se for necessário um solvente, há que realizar em paralelo um ensaio deste, com a mesma concentração de solvente que nas cubas de exposição ao produto químico em estudo. No caso dos produtos químicos difíceis de ensaiar, tecnicamente a melhor solução poderá ser o recurso a um solvente, devendo consultar-se o documento de orientações da OCDE sobre ensaios de toxicidade em meio aquático de substâncias e misturas difíceis (23). A escolha do solvente a utilizar depende das propriedades químicas da substância ou mistura em causa. O documento de orientações da OCDE recomenda que não se ultrapasse a concentração de 100 $\mu\text{l/l}$, o que deve ser respeitado. Importa, porém, referir que um estudo recente (24) veio acentuar as dúvidas acerca da utilização de solventes em ensaios de atividade endócrina. Por conseguinte, recomenda-se que se minimize, tanto quanto tecnicamente possível, a concentração do solvente que eventualmente seja necessário utilizar (a qual depende das propriedades físico-químicas do produto químico em estudo).
17. Os ensaios devem decorrer em fluxo contínuo. Neste sistema, tendo em vista a manutenção da série pretendida de concentrações nas cubas de ensaio, é fornecida e diluída continuamente (por exemplo: por meio de uma bomba doseadora, de um diluidor proporcional ou de um sistema saturador) uma solução de reserva do produto químico em estudo. Os caudais da solução de reserva e da água de diluição devem ser verificados regularmente durante o ensaio, de preferência diariamente, e não devem variar mais de 10 % ao longo do ensaio. Não deve utilizar-se tubagem de plástico de baixa qualidade ou outros materiais que possam conter produtos químicos biologicamente ativos. Ao selecionar o material para o sistema de fluxo contínuo, há que ter em conta a possibilidade de adsorção do produto químico em estudo ao material utilizado.

Aclimação dos peixes

18. Selecionam-se os peixes a utilizar no ensaio a partir de uma população do laboratório (de preferência proveniente do mesmo lote) que tenha sido mantida durante, pelo menos, as duas semanas anteriores ao ensaio em condições de qualidade da água e de iluminação idênticas às que nele se utilizarão. É importante que a taxa de carga e a densidade de ocupação (ver definições no apêndice 1) se adequem à espécie utilizada no ensaio (ver o apêndice 2).
19. Após um período de aclimação de 48 horas, regista-se a mortalidade e aplicam-se os seguintes critérios:
- mortalidade superior a 10 % da população num período de sete dias: rejeição da totalidade do lote;
 - mortalidade de 5 % a 10 % da população: aclimação durante um período adicional de sete dias; caso se verifique mortalidade superior a 5 % durante este segundo período de sete dias, rejeita-se a totalidade do lote;
 - mortalidade inferior a 5 % da população num período de sete dias: aceitação do lote.
20. Durante o período de aclimação, o período de pré-exposição e o período de exposição, não é ministrado aos peixes nenhum tratamento contra doenças.

Pré-exposição e seleção dos peixes

21. Recomenda-se um período de pré-exposição de uma a duas semanas, durante o qual os peixes são mantidos em cubas semelhantes às que se utilizarão no ensaio. Durante o período de aclimação e na fase de exposição, os peixes devem ser alimentados *ad libitum*. Inicia-se a fase de exposição utilizando peixes adultos com dimorfismo sexual provenientes de uma população do laboratório de peixes sexualmente maduros (que apresentem, por exemplo, caracteres sexuais secundários claramente visíveis, no caso do vairão-de-cabeça-grande e do peixe-do-arroz-japonês) e efetivamente em desova. Como orientação geral unicamente (que não se deve seguir sem ser complementada pela observação do estado reprodutivo real do lote de peixes em causa), os vairões-de-cabeça-grande devem ter cerca de $20 (\pm 2)$ semanas de idade, admitindo que foram mantidos a 25 ± 2 °C durante todo o seu tempo de vida; os peixes-do-arroz-japoneses devem ter cerca de $16 (\pm 2)$ semanas de idade, admitindo que foram mantidos a 25 ± 2 °C durante todo o seu tempo de vida; os peixes-zebra devem ter cerca de $16 (\pm 2)$ semanas de idade, admitindo que foram mantidos a 26 ± 2 °C durante todo o seu tempo de vida. Deve avaliar-se diariamente a produção de ovos durante a fase de pré-exposição. Recomenda-se a observação da desova em todas as cubas replicadas antes de passar à fase de exposição do ensaio. Não é ainda possível fornecer orientações quantitativas sobre a produção diária de ovos desejável, embora seja relativamente comum observar desovas superiores a 10 ovos diários por fêmea. Com vista a uma distribuição equilibrada dos replicados, recomenda-se que, na afetação destes aos diversos níveis de concentração ensaiados, se opte por uma organização em blocos e uma afetação aleatória em cada bloco, em função da produção de ovos.

PLANEAMENTO DO ENSAIO

22. Utilizam-se três concentrações do produto químico em estudo, uma cuba de controlo da água e, se necessário, uma cuba de controlo do solvente. É necessário analisar os dados para determinar eventuais diferenças com significância estatística entre as reações verificadas nas cubas expostas ao produto químico em estudo e na(s) cuba(s) de controlo. Mais do que servirem para a avaliação dos riscos, essas análises são úteis para determinar se é necessário pesquisar efeitos indesejados (ao nível da sobrevivência, do desenvolvimento, do crescimento e da reprodução) do produto químico em estudo através de ensaios mais longos (25).
23. No caso do peixe-zebra, recolhem-se amostras no 21.º dia do ensaio dos machos e fêmeas expostos a cada nível de concentração (5 machos e 5 fêmeas de cada duplicado) e da(s) cuba(s) de controlo, para determinação da vitelogenina. No caso do peixe-do-arroz-japonês, recolhem-se amostras no 21.º dia do ensaio dos machos e fêmeas expostos a cada nível de concentração (3 machos e 3 fêmeas de cada quadruplicado) e da(s) cuba(s) de controlo, para determinação da vitelogenina e dos caracteres sexuais secundários. No caso do vairão-de-cabeça-grande, recolhem-se amostras no 21.º dia de exposição dos machos e fêmeas expostos a cada nível de concentração (2 machos e 4 fêmeas de cada quadruplicado) e da(s) cuba(s) de controlo, para determinação da vitelogenina e dos caracteres sexuais secundários. É necessário quantificar a fecundidade; além disso, fixam-se os tecidos das gónadas *in situ* ou após dissecação, para eventual exame histopatológico.

Escolha das concentrações a utilizar no ensaio

24. A concentração mais elevada a utilizar neste ensaio é a mais baixa das seguintes concentrações: concentração máxima tolerada (CMT), obtida num ensaio preliminar de determinação da gama de concentrações a utilizar ou a partir de outros dados de toxicidade; 10 mg/l; solubilidade máxima em água. Define-se a concentração máxima tolerada como a concentração mais elevada do produto químico em estudo que, quando ensaiada, gera menos de 10 % de mortalidade. Esta abordagem pressupõe a existência de dados empíricos de toxicidade aguda ou outros dados de toxicidade a partir dos quais se pode estimar a concentração máxima tolerada. A estimativa da concentração máxima tolerada pode ser inexata e, normalmente, requer uma certa capacidade de apreciação na matéria.
25. Utilizam-se no ensaio três concentrações do produto químico em estudo, intervaladas por um fator constante não superior a 10, uma cuba de controlo da água de diluição e, se necessário, uma cuba de controlo do solvente. Recomenda-se que o fator que define o intervalo entre concentrações se situe entre 3,2 e 10.

PROTOCOLO DE ENSAIO

Seleção e pesagem dos peixes a utilizar no ensaio

26. É importante minimizar a variabilidade dos pesos dos peixes no início do ensaio. Indicam-se no apêndice 2 as gamas de pesos recomendadas para as várias espécies neste ensaio. Se possível, no início do ensaio, o peso de cada peixe macho e de cada peixe fêmea que constituem os peixes utilizados no ensaio não deve afastar-se mais de 20 % da média aritmética dos pesos do sexo correspondente. A fim de estimar o peso médio, recomenda-se a pesagem de uma subamostra do lote de peixes antes de iniciar o ensaio.

Condições de exposição*Duração*

27. O ensaio prolonga-se por 21 dias, após um período de pré-exposição. Recomenda-se que este último tenha a duração de uma a duas semanas.

Alimentação

28. Fornece-se aos peixes, *ad libitum*, uma alimentação adequada (apêndice 2), em quantidade e com frequência suficientes para os manter em boas condições físicas. Devem ser tomadas as precauções necessárias para evitar a proliferação de microrganismos e a turvação da água. Como indicação geral, a ração diária, em vez de ser fornecida de uma só vez, pode ser dividida em duas ou três doses iguais, a fornecer com, pelo menos, três horas de intervalo. É aceitável uma dose única maior, nomeadamente nos fins de semana. Não devem ser fornecidos alimentos aos peixes nas doze horas que antecedem a colheita de amostras/a necropsia.
29. É necessário verificar se, nos alimentos fornecidos aos peixes, estão presentes contaminantes, como pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e bifenilos policlorados. Importa não utilizar alimentos com teor elevado de fitoestrogénios, que comprometeriam a reação obtida no ensaio a um agonista de estrogénios conhecido (por exemplo, o 17 β -estradiol).
30. Removem-se os alimentos não ingeridos e as matérias fecais das cubas de ensaio pelo menos duas vezes por semana: por exemplo limpando cuidadosamente o fundo de cada cuba com um sifão.

Luz e temperatura

31. O fotoperíodo e a temperatura da água devem ser adequados à espécie utilizada no ensaio (ver o apêndice 2).

Frequência das medições e das determinações analíticas

32. Antes de iniciar o período de exposição, é necessário verificar se o sistema de distribuição do produto químico está a funcionar bem. Os métodos analíticos necessários devem estar bem estabelecidos, incluindo um conhecimento suficiente da estabilidade do produto químico no sistema de ensaio. Durante o ensaio, determinam-se a intervalos regulares as concentrações do produto químico em estudo, do seguinte modo: de preferência diariamente, mas, pelo menos, duas vezes por semana, verificam-se os caudais do diluente e da solução de reserva do produto químico tóxico, os quais não devem variar mais de 10 % ao longo do ensaio. Recomenda-se a medição das concentrações reais do produto químico em estudo, em todas as cubas, no início do ensaio e, em seguida, semanalmente.
33. Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. Todavia, se, durante todo o ensaio, as concentrações em solução do produto químico em estudo não se tiverem desviado, satisfatoriamente, mais de 20 % das concentrações nominais, os resultados podem basear-se nos valores nominais ou nos valores medidos.

34. As amostras podem precisar de ser centrifugadas ou filtradas (utilizando filtros com porosidade de 0,45 µm, por exemplo). Se for necessária uma destas operações, recomenda-se a centrifugação. No entanto, se o produto químico em estudo não se adsorver ao filtro, também é aceitável a filtração.
35. Durante o ensaio, medem-se, pelo menos semanalmente, o oxigénio dissolvido, a temperatura e o pH em cada cuba. Pelo menos uma vez por semana, medem-se a alcalinidade e a dureza total na(s) cuba(s) de controlo e numa das cubas com a concentração mais elevada. De preferência, monitoriza-se a temperatura continuamente em, pelo menos, uma cuba de ensaio.

Exames

36. Avalia-se uma série de reações genéricas (por exemplo a sobrevivência) e biológicas (por exemplo os níveis de vitelogenina) no decurso ou no termo do ensaio. É necessário determinar a fecundidade, quantitativamente, todos os dias. Descreve-se a seguir o modo de medição e de avaliação destes parâmetros e a utilidade dos mesmos.

Sobrevivência

37. Examinam-se diariamente os peixes ao longo do ensaio, registam-se os casos de mortalidade e retiram-se os peixes mortos o mais rapidamente possível. Os peixes mortos em qualquer das cubas (de exposição ou de controlo) não são substituídos. Determina-se o sexo dos peixes que morrerem durante o ensaio, por exame macroscópico das gónadas.

Comportamento e aspeto

38. Registam-se todos os comportamentos anormais (relativamente aos peixes de controlo), nomeadamente sinais de toxicidade generalizada, como hiperventilação, natação descoordenada, perda de equilíbrio e alimentação ou inatividade atípicas. Registam-se igualmente as anomalias externas (tais como hemorragias e descoloração). Estes sinais de toxicidade devem ser cuidadosamente tidos em conta na interpretação dos dados, pois podem indiciar concentrações às quais os biomarcadores de atividade endócrina não são fiáveis. Estes exames comportamentais também podem fornecer informações qualitativas úteis que permitam justificar futuramente determinadas exigências nos ensaios com peixes. Por exemplo, em vairões-de-cabeça-grande expostos a androgénios, observou-se agressividade territorial em machos normais e masculinização de fêmeas; em peixes-zebra expostos a estrogénios ou a antiandrogénios, verificou-se redução ou perturbação do comportamento de acasalamento e de desova característico após a alvorada.
39. Dado que a manipulação dos peixes pode modificar rapidamente determinadas características do aspeto dos mesmos (nomeadamente a cor), é importante que os exames qualitativos tenham lugar antes de os animais serem retirados do sistema de ensaio. A experiência recolhida até à data com vairões-de-cabeça-grande aponta para que alguns produtos químicos com atividade endócrina podem começar por induzir alterações das seguintes características externas: cor do corpo (clara ou escura), padrões de coloração (ocorrência de listas verticais) e forma do corpo (cabeça e região peitoral). Por conseguinte, o aspeto físico dos peixes deve ser examinado ao longo do ensaio e no termo do estudo.

Fecundidade

40. Devem ser efetuados registos quantitativos diários da desova por replicado, registando-se a produção diária de ovos por fêmea sobrevivente em cada replicado. Os ovos devem ser retirados diariamente das cubas de ensaio. A fim de propiciar aos peixes condições normais de desova, devem colocar-se substratos de desova nas cubas de ensaio dos vairões-de-cabeça-grande e dos peixes-zebra. Fornecem-se no apêndice 4 elementos pormenorizados sobre os substratos de desova recomendados para os peixes-zebra (apêndice 4A) e os vairões-de-cabeça-grande (apêndice 4B). No caso dos peixes-do-arroz-japoneses não se considera necessário um substrato de desova.

Eutanásia dos peixes

41. No 21.º dia, ou seja, no final da exposição, eutanasiam-se os peixes com quantidades adequadas de triclaína — solução 100-500 mg/l de metanossulfonato de triclaína (metacilaína, MS-222, CAS 886-86-2), tamponada com solução 300 mg/l de NaHCO₃ (bicarbonato de sódio, CAS 144-55-8) –, para reduzir a irritação das mucosas. Em seguida, colhem-se amostras de sangue ou de tecidos para determinação da vitelogenina, como se explica no item correspondente.

Exame de caracteres sexuais secundários

42. Alguns produtos químicos com atividade endócrina podem induzir alterações em caracteres sexuais secundários especializados (número de tubérculos nupciais no vairão-de-cabeça-grande macho, processos papilares no peixe-do-arroz-japonês macho). Alguns produtos químicos com determinados modos de ação podem, nomeadamente, ser responsáveis pela ocorrência anormal de caracteres sexuais secundários em animais do sexo oposto. Por exemplo, agonistas dos recetores de androgénios, como a trembolona, a metiltestosterona e a di-hidro-testosterona, podem provocar o aparecimento de tubérculos nupciais pronunciados na fêmea do vairão-de-cabeça-grande ou de processos papilares na fêmea do peixe-do-arroz-japonês (11) (20) (21). Também há registo de que os agonistas dos recetores de estrogénios podem reduzir o número de tubérculos nupciais e o volume da massa adiposa dorsal situada na base da cabeça dos machos adultos de vairão-de-cabeça-grande (26) (27). Estes exames morfológicos macroscópicos podem fornecer informações qualitativas e quantitativas úteis que permitam justificar futuramente determinadas exigências nos ensaios com peixes. O número e a dimensão dos tubérculos nupciais no vairão-de-cabeça-grande e dos processos papilares no peixe-do-arroz-japonês podem ser imediatamente quantificados ou — o que é mais prático — sê-lo em espécimes conservados. Nos apêndices 5A e 5B recomendam-se procedimentos para a avaliação dos caracteres sexuais secundários, respetivamente do vairão-de-cabeça-grande e do peixe-do-arroz-japonês.

Vitelogenina (VTG)

43. Colhe-se uma amostra de sangue na artéria/veia caudal com um microtubo capilar heparinizado para determinação do hematócrito ou, em alternativa, por punção cardíaca com uma seringa. O volume de sangue colhido depende do tamanho do peixe e geralmente situa-se entre 5 µl e 60 µl por espécime no caso do vairão-de-cabeça-grande e entre 5 µl e 15 µl por espécime no caso do peixe-do-arroz-japonês. Separa-se o plasma do resto do sangue por centrifugação e armazena-se a – 80 °C com inibidores das proteases, até à determinação analítica da vitelogenina. Em alternativa, como fonte de tecidos para determinação da vitelogenina, pode utilizar-se o fígado, no caso do peixe-do-arroz-japonês, e homogeneizado da cabeça e da cauda, no caso do peixe-zebra (apêndice 6). A vitelogenina deve ser determinada por um método ELISA homólogo validado, utilizando anticorpos homólogos e um padrão homólogo de vitelogenina. Recomenda-se o recurso a um método que permita detetar níveis de vitelogenina da ordem de alguns nanogramas por mililitro de plasma (ou nanogramas por miligrama de tecido), correspondentes ao nível de fundo dos peixes machos não-expostos.
44. O controlo de qualidade da análise da vitelogenina assenta na utilização de padrões, brancos e, pelo menos, duplicados. É necessário realizar um ensaio do efeito da matriz (efeito da diluição da amostra) em cada método ELISA, a fim de determinar o fator de diluição mínimo das amostras. Cada placa utilizada num método ELISA para determinação da vitelogenina deve incluir as seguintes amostras de controlo da qualidade: pelo menos 6 padrões de calibração que cubram o intervalo das concentrações previstas de vitelogenina e, pelo menos, um branco de ligações inespecíficas (analisado em duplicado). A absorvência destes brancos deve ser inferior a 5 % da absorvência máxima dos padrões de calibração. Analisam-se, pelo menos, duas alíquotas (alvéolos duplicados) de cada diluição da amostra. Reanalisam-se os alvéolos duplicados cujos resultados difiram mais de 20 %.
45. O coeficiente de correlação (R^2) das curvas de calibração deve ser superior a 0,99. Todavia, uma correlação elevada não é, por si só, garantia suficiente de capacidade de previsão adequada da concentração em toda a gama de concentrações. Além da correlação suficientemente elevada da curva de calibração, é necessário que a concentração de cada padrão, calculada a partir da curva de calibração, se situe entre 70 % e 120 % da concentração nominal correspondente. Se as concentrações nominais evidenciarem uma tendência de afastamento da reta de regressão de calibração (por exemplo a baixas concentrações), pode ser necessário dividir a curva de calibração numa gama alta e numa gama baixa ou recorrer a um modelo não linear que se ajuste adequadamente aos dados de absorvência. Se a curva for dividida, é necessário que, em ambos os segmentos de reta, $R^2 > 0,99$.
46. Define-se «limite de deteção» como a concentração do padrão analítico de concentração mais baixa e «limite de quantificação» como a concentração do padrão analítico de concentração mais baixa, multiplicada pelo fator de diluição mais baixo.
47. Em cada dia em que se realizem determinações da vitelogenina, analisa-se uma amostra enriquecida com um padrão de referência interno (apêndice 7). Juntamente com os resultados de cada série de ensaios realizados no dia, indica-se no relatório a relação entre a concentração esperada e a concentração medida.

Exame histopatológico das gónadas

48. As autoridades reguladoras podem exigir um exame histopatológico das gónadas para estudo do órgão-alvo do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas após a exposição ao produto químico. Para isso, procede-se à fixação das gónadas *in situ* ou após dissecação. Se for exigido exame histopatológico, pesquisar-se-ão reações endócrinas específicas nas gónadas aquando da avaliação da atividade endócrina do produto químico em estudo. As reações de diagnóstico compreendem, essencialmente, a presença de ovócitos testiculares, hiperplasia das células de Leydig, diminuição da formação de vitelo, aumento das espermatogónias e hiperplasia perifolicular. Outras lesões das gónadas, como atresia dos ovócitos, degenerescência testicular e alterações de estádios, podem ter causas diversas. O documento de orientações sobre histopatologia das gónadas em peixes descreve os procedimentos a seguir na dissecação, na fixação, no corte e no exame histopatológico das gónadas (22).

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação das reações dos biomarcadores por análise da variância (ANOVA)

49. A fim de identificar atividade potencial do produto químico em estudo, comparam-se as reações obtidas para os grupos expostos e para os grupos de controlo por meio de uma análise de variância (ANOVA). Caso se utilize uma cuba de controlo do solvente, é necessário efetuar, para cada parâmetro, um teste estatístico adequado de comparação entre a cuba de controlo da água de diluição e a cuba de controlo do solvente. A referência (28) [OCDE (2006c)] fornece orientações sobre o tratamento de análise estatística a dar aos dados relativos à cuba de controlo da água de diluição e à cuba de controlo do solvente. Os dados relativos às reações biológicas analisam-se e apresentam-se no relatório, separadamente, por sexo. Se as exigências dos métodos paramétricos não forem satisfeitas — distribuição não-normal (teste de Shapiro-Wilk, por exemplo) ou variância heterogénea (teste de Bartlett ou teste de Levene) —, deve equacionar-se a possibilidade de proceder a uma transformação dos dados, para homogeneizar as variâncias antes da análise de variância, ou de optar por uma análise de variância ponderada. Se a relação entre a dose fornecida e a reação obtida não for monótona, pode aplicar-se o teste (paramétrico) de Dunnett a múltiplas comparações par a par ou recorrer-se ao teste (não-paramétrico) de Mann-Whitney com ajustamento de Bonferroni. Se a relação entre a dose fornecida e a reação obtida for aproximadamente monótona, pode recorrer-se a outros testes estatísticos: por exemplo o teste de Jonckheere-Terpstra ou o teste de Williams. O fluxograma do apêndice 8 visa facilitar a escolha do teste estatístico mais adequado. O documento da OCDE sobre as abordagens atuais na análise estatística de dados de ecotoxicidade (28) contém informações complementares.

Relatório dos resultados do ensaio

50. Dados do estudo a fornecer:

Instalações nas quais se realizaram os ensaios:

- pessoal responsável e responsabilidades de cada um no estudo;
- competência técnica do laboratório, previamente demonstrada para uma gama de produtos químicos representativos.

Produto químico em estudo

- caracterização do produto químico;
- estado físico e propriedades físico-químicas relevantes;
- método e frequência de preparação das concentrações utilizadas no ensaio;
- informações sobre estabilidade e biodegradabilidade.

Solvente

- caracterização do solvente (natureza, concentração utilizada);
- justificação da escolha do solvente (se não for água).

Animais utilizados no ensaio

- espécie e estirpe;
- fornecedor e instalações específicas do fornecedor;
- idade dos peixes no início do ensaio e estado reprodutivo ou estado de desova dos peixes;
- elementos relativos ao processo de aclimação dos peixes;
- peso corporal dos peixes no início da exposição (determinado a partir de uma subamostra do lote de peixes).

Condições de realização do ensaio

- protocolo de ensaio utilizado (tipo de ensaio, taxa de carga, densidade de ocupação etc.);
- método de preparação das soluções de reserva e caudal;
- concentrações de ensaio nominais, concentrações das soluções utilizadas no ensaio (medidas semanalmente) e métodos analíticos para esse efeito, médias dos valores medidos nas cubas de ensaio e desvios-padrão correspondentes e elementos comprovativos de que as medições dizem respeito às concentrações reais do produto químico em solução;
- características da água de diluição (pH, dureza, alcalinidade, temperatura, concentração de oxigénio dissolvido, níveis de cloro residuais, carbono orgânico total, sólidos em suspensão e outras medições efetuadas);
- qualidade da água nas cubas de ensaio: pH, dureza, temperatura e concentração de oxigénio dissolvido;
- informações pormenorizadas sobre a alimentação dos peixes — por exemplo, tipo(s) e proveniência do alimento, quantidade e frequência do fornecimento de alimento e resultados das análises de contaminantes relevantes (por exemplo, bifenilos policlorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e pesticidas organoclorados), se disponíveis.

Resultados

- elementos comprovativos de que as cubas de controlo respeitaram os critérios de aceitação do ensaio;
- dados relativos à mortalidade ocorrida para cada concentração ensaiada e nas cubas de controlo;
- técnicas de análise estatística utilizadas, tratamento dos dados e justificação das técnicas;
- dados relativos ao exame biológico da morfologia macroscópica (incluindo caracteres sexuais secundários), à produção de ovos e à vitelogenina;
- resultados das análises dos dados, de preferência reunidos em quadros e sob a forma de gráficos;
- incidência de reações inabituais manifestadas pelos peixes e de efeitos visíveis do produto químico em estudo.

ORIENTAÇÕES PARA INTERPRETAÇÃO E ACEITAÇÃO DOS RESULTADOS DO ENSAIO

51. Nesta secção reflete-se sobre a interpretação dos resultados obtidos no ensaio, em relação aos diversos parâmetros medidos. Se o produto químico em estudo parecer ter efeitos tóxicos manifestos ou influenciar o estado geral dos animais ensaiados, os resultados obtidos devem ser interpretados com precaução.
52. Ao escolher a gama de concentrações a utilizar num ensaio, não deve exceder-se a concentração máxima tolerada, a fim de possibilitar uma interpretação dos dados que tenha significado. Importa que, pelo menos, uma das concentrações de exposição não gere sinais de efeitos tóxicos. Os sintomas de doenças e os sinais de efeitos tóxicos devem ser cuidadosamente avaliados e descritos no relatório. Por exemplo, a produção de vitelogenina nas fêmeas também pode ser influenciada por toxicidade generalizada e por modos de ação tóxica não-endócrinos, caso da hepatotoxicidade. Porém, a interpretação dos efeitos pode ser facilitada por outros níveis de exposição, cujos efeitos não sejam perturbados por toxicidade sistémica.

53. Há vários aspetos a ponderar na aceitação dos resultados de um ensaio. Como orientação, os níveis de vitelogenina de machos e fêmeas nos grupos de controlo devem diferir entre si, pelo menos, de três ordens de grandeza, no caso do vairão-de-cabeça-grande e do peixe-zebra, e cerca de uma ordem de grandeza, no caso do peixe-do-arroz-japonês. Os relatórios de validação (1) (2) (3) (4) apresentam exemplos de valores determinados em grupos de controlo e grupos expostos. Se os machos de controlo apresentarem valores de vitelogenina elevados, podem ficar comprometidas a sensibilidade do ensaio e a capacidade de deteção de agonistas fracos de estrogénios. Se as fêmeas de controlo apresentarem valores de vitelogenina baixos, podem ficar comprometidas a sensibilidade do ensaio e a capacidade de deteção de inibidores da aromatase e de antagonistas de estrogénios. Estas orientações baseiam-se nos estudos de validação.
54. A quantificação da produção de ovos está sujeita a importantes variações (o coeficiente de variação pode ser de 20 % a 60 %), que diminuem a capacidade do ensaio de detetar reduções significativas da produção de ovos abaixo dos 70 %, à medida que o coeficiente de variação vai aumentando e se aproxima de 50 %. Se o coeficiente de variação for baixo (20-30 %), o ensaio terá representatividade estatística aceitável (80 %) para detetar decréscimos de 40-50 % na produção de ovos. A inclusão planeada de quatro replicados, por nível de exposição, no ensaio do vairão-de-cabeça-grande confere maior representatividade estatística ao parâmetro «fecundidade» comparativamente a um ensaio baseado em apenas dois replicados.
55. Se o laboratório nunca tiver realizado este ensaio ou se tiverem sido efetuadas alterações substanciais (mudança do fornecedor ou da estirpe dos peixes, por exemplo), é aconselhável realizar um estudo de competência técnica. Nesse caso, recomenda-se que o estudo abranja produtos químicos que cubram diversos modos de ação ou efeitos em vários dos parâmetros avaliados no ensaio. Na prática, incentiva-se cada laboratório a constituir um registo de dados históricos de controlo de machos e fêmeas e a realizar um ensaio de controlo positivo de um produto químico com atividade estrogénica (por exemplo: 17 β -estradiol a 100 ng/l ou um agonista fraco conhecido) que aumente o nível de vitelogenina nos peixes machos, um ensaio de controlo positivo de um produto químico inibidor da aromatase (por exemplo: fadrozole ou procloraz a 300 μ g/l) que diminua a vitelogenina nos peixes fêmeas e um ensaio de controlo positivo de um produto químico com atividade androgénica (por exemplo: 17 β -trembolona a 5 μ g/l) que induza caracteres sexuais secundários em fêmeas do vairão-de-cabeça-grande e do peixe-do-arroz-japonês. Para ajuizar da competência do laboratório, comparam-se os dados assim obtidos com os dados provenientes dos estudos de validação (1) (2) (3).
56. Em geral, na ausência de sinais de toxicidade generalizada, considera-se positivo um resultado obtido em medições de vitelogenina caso se verifique um aumento, com significância estatística, da vitelogenina nos machos ($p < 0,05$) ou uma diminuição, com significância estatística, da vitelogenina nas fêmeas ($p < 0,05$), pelo menos para a maior dose ensaiada, comparativamente ao grupo de controlo. Corrobora ainda um resultado positivo a demonstração de uma relação biologicamente plausível entre a dose e a curva de resposta às doses. Como já se referiu, a diminuição do nível de vitelogenina pode não ser de origem totalmente endócrina. Porém, um resultado positivo deve, geralmente, ser interpretado como prova de atividade endócrina *in vivo* e, normalmente, deve dar lugar a uma pesquisa mais aprofundada.
57. As autoridades reguladoras podem exigir um exame histopatológico das gónadas para determinar a aptidão reprodutiva dos animais ensaiados e avaliar os resultados do ensaio com base no princípio da ponderação da suficiência da prova. Pode não ser necessário um exame histopatológico das gónadas se o resultado for positivo para o parâmetro vitelogenina ou o parâmetro caracteres sexuais secundários (isto é, aumento ou diminuição da vitelogenina ou indução de caracteres sexuais secundários).

REFERÊNCIAS

- 1) OCDE (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 60. Paris.
- 2) OCDE (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 61. Paris.
- 3) OCDE (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 78. Paris.

- 4) Owens, J.W. (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine (<http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> — acesso em 18/9/2008).
- 5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 de dezembro de 2007. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota (104 pp.).
- 6) OCDE (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 94. Paris.
- 7) Sumpter, J.P., Jobling, S. (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*, 103, Suppl. 7:173-8, review.
- 8) Pawlowski, S., et al. (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*, 68(3):277-91.
- 9) Andersen, L., et al. (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 76(3-4):343-52.
- 10) Ankley, G.T., et al. (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*, 67(1):121-30.
- 11) Panter, G.H., et al. (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*, 70(1):11-21.
- 12) Parks, L.G., et al. (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C — Pharmacology, toxicology and endocrinology*, 123(2):113-25.
- 13) Panter, G.H., et al. (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Bruxelas, Bélgica.
- 14) Fenske, M., et al. (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys., C*, 129 (3): 217-232.
- 15) Holbech, H., et al. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C — Pharmacology, toxicology and endocrinology*, 130:119-131.
- 16) Rose, J., et al. (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol., C*, 131:531-539.
- 17) Brion, F., et al. (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 21:1699-1708.
- 18) Yokota, H., et al. (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, 4:87-98.
- 19) Tatarazako, N., et al. (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science*, 50:301-308.
- 20) Ankley, G.T., et al. (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(6):1350-60.

- 21) Seki, M., *et al.* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(3):774-81.
 - 22) OCDE (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 123. Paris.
 - 23) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 23. Paris.
 - 24) Hutchinson, T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. *Aquatic Toxicology*, 76; pp. 69–92.
 - 25) Hutchinson, T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as «signposts», not «traffic lights» in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 114, Suppl. 1:106-14.
 - 26) Miles-Richardson, S.R., *et al.* (1999). Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.*, 47, 129-145.
 - 27) Martinovic, D., *et al.* (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27, 478-488.
 - 28) OCDE (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. OCDE, Paris.
 - 29) US EPA (2008). Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay (30 de janeiro de 2008). US Environmental Protection Agency, Washington DC (110 pp.).
 - 30) OCDE (2012). OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 150. OCDE, Paris.
-

Apêndice 1

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

Produto químico: Substância ou mistura.

CV: Coeficiente de variação.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): Ensaio de imunossorção com ligação enzimática.

Eixo HHG: Eixo hipotálamo-hipófise-gónadas.

Taxa de carga: Peso húmido de peixe por volume de água.

CMT: Concentração máxima tolerada; representa cerca de 10 % da CL₅₀.

Densidade de ocupação: Número de peixes por volume de água.

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

VTG (vitelogenina): Fosfolipoglicoproteína precursora das proteínas do vitelo, que normalmente ocorre nas fêmeas sexualmente ativas de todas as espécies ovíparas.

Apêndice 2

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO ENSAIO DE DESPISTAGEM DE ATIVIDADE ENDÓCRINA EM PEIXES

1. Espécies recomendadas	Vairão-de-cabeça-grande (<i>Pimephales promelas</i>)	Peixe-do-arroz-japonês (<i>Oryzias latipes</i>)	Peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)
2. Tipo de ensaio	Fluxo contínuo	Fluxo contínuo	Fluxo contínuo
3. Temperatura da água	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Iluminação	Lâmpadas fluorescentes (espectro largo)	Lâmpadas fluorescentes (espectro largo)	Lâmpadas fluorescentes (espectro largo)
5. Intensidade luminosa	10-20 µE/m²/s, 540-1 000 lux ou 50-100 ft-c (níveis ambientes no laboratório)	10-20 µE/m²/s, 540-1 000 lux ou 50-100 ft-c (níveis ambientes no laboratório)	10-20 µE/m²/s, 540-1 000 lux ou 50-100 ft-c (níveis ambientes no laboratório)
6. Fotoperíodo (as transições alvorada e crepúsculo não são consideradas necessárias e são facultativas)	16 horas de luz, seguidas de 8 horas de escuridão	12-16 horas de luz, seguidas de 12-8 horas de escuridão	12-16 horas de luz, seguidas de 12-8 horas de escuridão
7. Taxa de carga	< 5 g por litro	< 5 g por litro	< 5 g por litro
8. Volume de cada cuba	10 l (mínimo)	2 l (mínimo)	5 l (mínimo)
9. Volume de solução em cada cuba	8 l (mínimo)	1,5 l (mínimo)	4 l (mínimo)
10. Substituição total do volume de solução em cada cuba	Mínimo: 6 diárias	Mínimo: 5 diárias	Mínimo: 5 diárias
11. Idade dos organismos utilizados no ensaio	Ver o ponto 21.	Ver o ponto 21.	Ver o ponto 21.
12. Peso húmido aproximado de um peixe adulto (g)	Fêmeas: 1,5 ± 20 % Machos: 2,5 ± 20 %	Fêmeas: 0,35 ± 20 % Machos: 0,35 ± 20 %	Fêmeas: 0,65 ± 20 % Machos: 0,4 ± 20 %
13. Número de peixes por cuba	6 (2 machos e 4 fêmeas)	6 (3 machos e 3 fêmeas)	10 (5 machos e 5 fêmeas)
14. Número de concentrações de exposição	3 (mais as cubas de controlo adequadas)	3 (mais as cubas de controlo adequadas)	3 (mais as cubas de controlo adequadas)
15. Número de cubas por concentração de exposição	Mínimo 4	Mínimo 4	Mínimo 2
16. Número de peixes por concentração ensaiada	16 fêmeas adultas e 8 machos adultos (4 fêmeas e 2 machos em cada cuba replicada)	12 fêmeas adultas e 12 machos adultos (3 fêmeas e 3 machos em cada cuba replicada)	10 fêmeas adultas e 10 machos adultos (5 fêmeas e 5 machos em cada cuba replicada)

17. Alimentação	Artémias adultas ou náuplios de artémias, vivos ou congelados, duas ou três vezes por dia (<i>ad libitum</i>), alimento para peixes disponível no comércio ou uma combinação dos dois	Náuplios de artémias duas ou três vezes por dia (<i>ad libitum</i>), alimento para peixes disponível no comércio ou uma combinação dos dois	Náuplios de artémias duas ou três vezes por dia (<i>ad libitum</i>), alimento para peixes disponível no comércio ou uma combinação dos dois
18. Arejamento	Nenhum, salvo se a concentração de oxigénio dissolvido descer abaixo de 60 % do valor da saturação com ar	Nenhum, salvo se a concentração de oxigénio dissolvido descer abaixo de 60 % do valor da saturação com ar	Nenhum, salvo se a concentração de oxigénio dissolvido descer abaixo de 60 % do valor da saturação com ar
19. Água de diluição	Água de superfície, de poço ou reconstituída, ou água da torneira desclorada, limpa	Água de superfície, de poço ou reconstituída, ou água da torneira desclorada, limpa	Água de superfície, de poço ou reconstituída, ou água da torneira desclorada, limpa
20. Período de pré-exposição	7-14 dias (recomendado)	7-14 dias (recomendado)	7-14 dias (recomendado)
21. Duração da exposição ao produto químico	21 dias	21 dias	21 dias
22. Parâmetros biológicos	— sobrevivência — comportamento — fecundidade — caracteres sexuais secundários — vitelogenina — histopatologia das gónadas (facultativo)	— sobrevivência — comportamento — fecundidade — caracteres sexuais secundários — vitelogenina — histopatologia das gónadas (facultativo)	— sobrevivência — comportamento — fecundidade — vitelogenina — histopatologia das gónadas (facultativo)
23. Aceitabilidade do ensaio	concentração de oxigénio dissolvido > 60 % do valor de saturação; temperatura média de 25 ± 2 °C; 90 % de peixes sobreviventes nas cubas de controlo; concentrações medidas no ensaio situadas num intervalo de ± 20 % relativamente à média dos valores medidos, para cada nível de exposição.	concentração de oxigénio dissolvido > 60 % do valor de saturação; temperatura média de 25 ± 2 °C; 90 % de peixes sobreviventes nas cubas de controlo; concentrações medidas no ensaio situadas num intervalo de ± 20 % relativamente à média dos valores medidos, para cada nível de exposição.	concentração de oxigénio dissolvido > 60 % do valor de saturação; temperatura média de 26 ± 2 °C; 90 % de peixes sobreviventes nas cubas de controlo; concentrações medidas no ensaio situadas num intervalo de ± 20 % relativamente à média dos valores medidos, para cada nível de exposição.

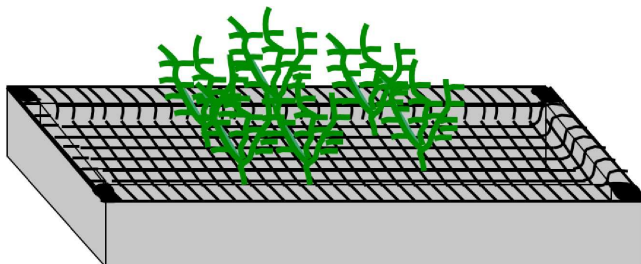
*Apêndice 3***ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL**

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amoníaco não-ionizado	< 1 µg/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

Apêndice 4A

SUBSTRATO DE DESOVA PARA PEIXES-ZEBRA

Placa de desova: Tabuleiro de instrumentos totalmente em vidro — por exemplo com 22 cm de comprimento, 15 cm de largura e 5,5 cm de profundidade —, coberto com uma grelha amovível de arame de aço inoxidável (malha de 2 mm de largura). A base desta grelha de cobertura está a um nível inferior ao rebordo do tabuleiro.



Fixa-se um substrato de desova à grelha, de modo a formar uma estrutura na qual os peixes possam penetrar. São adequadas, por exemplo, plantas de aquário artificiais de plástico verde (nota: deve avaliar-se a possibilidade de adsorção do produto químico em estudo ao plástico). Mergulham-se previamente os elementos de plástico num volume de água tépida suficiente, durante tempo suficiente para que deles não passem produtos químicos para a água utilizada nos ensaios. Caso se utilizem objetos de vidro, os peixes não devem poder ferir-se neles nem ser por eles tolhidos nos seus movimentos vigorosos.

A distância entre a base desta placa e as paredes do tabuleiro de vidro não deve ser inferior a 3 cm, para que a desova não possa ocorrer fora dela. Os ovos postos sobre a placa atravessam a grelha e podem ser colhidos 45 a 60 minutos após o início da iluminação. Os ovos são transparentes e não-aderentes, podendo ser contados com facilidade utilizando luz lateral. Quando cada cuba alberga cinco fêmeas, pode considerar-se baixo um número diário de ovos até 20, médio entre 20 e 100 e alto se superior a 100. O mais tarde possível à noite ou de manhã muito cedo, retira-se a placa de desova, colhem-se os ovos e recoloca-se a placa na cuba de ensaio. A recolocação da placa na cuba não deve tardar mais de uma hora; caso contrário, o ressurgimento do substrato de desova pode induzir acasalamentos e desova fora de tempo. Se for inevitável recolocar a placa de desova mais tarde do que passada uma hora, a recolocação deve ocorrer pelo menos nove horas após o início da iluminação. A essa hora tardia do dia já não haverá indução de desova.

Apêndice 4B

SUBSTRATO DE DESOVA PARA VAIRÕES-DE-CABEÇA-GRANDE

Colocam-se em cada cuba de ensaio duas ou três combinações de placa e cobertura de desova de plástico, cerâmica, vidro ou aço inoxidável (por exemplo, uma secção de caleira cinzenta com 80 mm de comprimento pousada numa placa de 130 mm de comprimento com rebordos — ver a fotografia). Verificou-se que coberturas de PVC ou cerâmicas adequadamente tratadas podem servir de substrato de desova (Thorpe *et al.*, 2007).

Recomenda-se que as coberturas sejam raspadas, para melhorar a aderência. A placa também deve ter uma proteção que impeça os peixes de alcançarem os ovos que caíam, a menos que se tenha demonstrado que os ovos aderem eficazmente ao substrato de desova utilizado.



A base destina-se a receber os ovos que, por não aderirem à superfície da cobertura, cairão no fundo da cuba (ou os ovos diretamente depositados na base plana de plástico do conjunto). Antes da utilização, mergulham-se os substratos de desova em água de diluição durante, pelo menos, 12 horas.

Thorpe, K.L., Benstead, R., Hutchinson, T.H., Tyler, C.R. (2007). An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

Apêndice 5A

AValiação DE CARACTERES SEXUAIS SECUNDÁRIOS NO VAIRÃO-DE-CABEÇA-GRANDE PARA DETeção DE DETERMINADOS PRODUTOS QUÍMICOS COM ATIVIDADE ENDOCRINA**Resumo**

No vairão-de-cabeça-grande adulto, entre as características físicas que podem ter importância nos ensaios de desreguladores do sistema endócrino contam-se as seguintes: cor do corpo (clara ou escura), padrões de coloração (ocorrência ou ausência de listas verticais), forma do corpo (forma da cabeça e da região peitoral, distensão do abdômen) e caracteres sexuais secundários específicos (número e tamanho dos tubérculos nupciais, volume da massa adiposa dorsal e ovipositor)

No vairão-de-cabeça-grande, os tubérculos nupciais localizam-se na (massa adiposa dorsal da) cabeça dos machos reprodutores, em geral com simetria bilateral (Jensen *et al.*, 2001). Nas fêmeas de controlo e nos machos e fêmeas juvenis não se desenvolvem tubérculos (Jensen *et al.*, 2001). Podem existir até oito tubérculos distintos em volta dos olhos e entre as narinas dos machos. O maior número de tubérculos e os tubérculos maiores localizam-se em duas linhas paralelas imediatamente abaixo das narinas e acima da boca. Em muitos espécimes surgem grupos de tubérculos abaixo da mandíbula. O grupo mais próximo da boca é normalmente constituído por um só par, ao passo que o grupo em posição mais ventral pode compreender até quatro tubérculos. O número de tubérculos raramente excede 30 (intervalo: 18-28; Jensen *et al.*, 2001). Os tubérculos (numericamente) predominantes formam uma estrutura arredondada e a sua altura é aproximadamente igual ao raio. Na sua maior parte, os machos reprodutores também evidenciam, pelo menos, alguns tubérculos dilatados e salientes, não sendo possível individualizar a estrutura de cada tubérculo.

Alguns tipos de produtos químicos desreguladores do sistema endócrino podem provocar a ocorrência anormal de determinados caracteres sexuais secundários no sexo oposto. Por exemplo, agonistas dos recetores de androgénios, como a 17 α -metiltestosterona ou a 17 β -trembolona, podem provocar o aparecimento de tubérculos nupciais nas fêmeas de vairão-de-cabeça-grande (Smith, 1974; Ankley *et al.*, 2001, 2003) e os agonistas dos recetores de estrogénios podem reduzir o número ou a dimensão dos tubérculos nupciais nos machos (Miles-Richardson *et al.*, 1999; Harries *et al.*, 2000).

Segue-se uma descrição da caracterização dos tubérculos nupciais no vairão-de-cabeça-grande, com base no protocolo seguido pelo laboratório da Agência de Proteção do Ambiente, dos E.U.A. (Duluth, MN). Os produtos e equipamentos indicados podem ser substituídos por equivalentes disponíveis.

Para melhor visualização, pode utilizar-se uma lupa com iluminação ou um microscópio de dissecação com iluminação (3X). Examinam-se os peixes em posição dorsal, com a parte anterior para a frente (cabeça orientada para o observador).

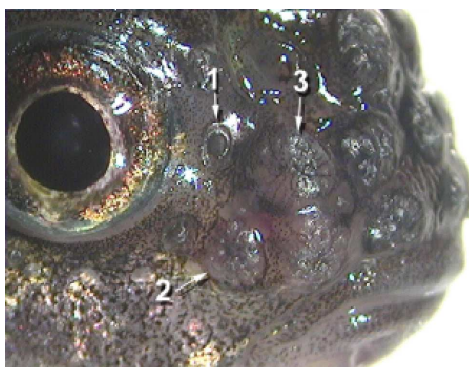
- Coloca-se o peixe numa placa de Petri (por exemplo com 100 mm de diâmetro) com a parte anterior para a frente e o ventre para baixo. Foca-se o dispositivo ótico, a fim de identificar os tubérculos. Roda-se lateralmente o peixe, com cuidado, para identificar as zonas tuberculizadas. Contam-se e classificam-se os tubérculos.
- Repete-se o exame na parte ventral da cabeça, colocando o peixe na placa de Petri com a parte anterior para a frente e o dorso para baixo.
- O tempo necessário para examinar cada peixe é normalmente de 2 minutos.

Contagem e classificação dos tubérculos

Identificaram-se seis zonas específicas para avaliação da presença e do grau de desenvolvimento de tubérculos no vairão-de-cabeça-grande adulto. Para localizar e quantificar os tubérculos presentes criou-se a matriz apresentada no final deste apêndice. Regista-se o número de tubérculos e estabelece-se a seguinte classificação dimensional para cada organismo: 0-ausente, 1-presente, 2-dilatado, 3-saliente (figura 1).

Classe 0: ausente — nenhum tubérculo presente; classe 1: presente — tubérculo cuja altura é quase equivalente ao raio num ponto; classe 2: dilatado — tubérculo identificável por tecidos de aspeto semelhante a um asterisco, normalmente com uma base larga em todo o perímetro e estrias ou rugas a divergir do centro; em altura é muitas vezes mais irregular, mas o tubérculo também pode ser arredondado; classe 3: saliente — tubérculo normalmente bastante grande e arredondado, com estrutura menos definida; por vezes, os tubérculos deste tipo coalescem e formam uma massa única numa zona ou ocupando várias zonas (B, C e D na descrição *infra*); a cor e a forma dos tubérculos deste tipo são semelhantes às da classe 2, mas, por vezes, os tubérculos são difíceis de individualizar nesta base. Utilizando este sistema de classificação de tubérculos, normalmente a pontuação atribuída é inferior a 50, no caso de um macho de controlo normal com 18 a 20 tubérculos (Jensen *et al.*, 2001).

Figura 1



Em alguns peixes, o número de tubérculos numa determinada zona de classificação pode exceder as casas previstas na matriz. Se isso suceder, podem ser acrescentados números de classificação adicionais entre casas ou à esquerda ou direita das casas. A matriz não tem, portanto, de ser simétrica. Outra técnica, para localização de tubérculos emparelhados ou que coalesçam na vertical no plano horizontal da boca, consiste em indicar, na mesma caixa, a classificação correspondente a cada tubérculo do par.

Regiões da localização:

A — Tubérculos situados em volta dos olhos. Localizados em volta do lado anterior do contorno dos olhos, indicam-se na matriz do lado dorsal para o lado ventral. É comum serem múltiplos nos machos maduros de controlo, não estão presentes nas fêmeas de controlo e geralmente ocorre um par (um tubérculo próximo de cada olho) ou um único tubérculo nas fêmeas expostas a androgénios.

B-Tubérculos situados entre as narinas (poros dos canais sensoriais). Ocorrem normalmente aos pares nos machos de controlo, com os níveis de desenvolvimento mais elevados — 2 (dilatado) ou 3 (saliente). Ausentes nas fêmeas de controlo, mas por vezes presentes e desenvolvidos em fêmeas expostas a androgénios.

C — Tubérculos situados em posição imediatamente anterior às narinas, paralelamente à boca. Nos machos maduros de controlo são geralmente dilatados ou salientes. Presentes ou dilatados em machos menos desenvolvidos e nas fêmeas expostas a androgénios.

D — Tubérculos situados paralelamente, ao longo da linha definida pela boca. Nos machos de controlo, normalmente recebem uma classificação de desenvolvidos. Ausentes nas fêmeas de controlo, mas presentes nas fêmeas expostas a androgénios.

E — Tubérculos situados na mandíbula, perto da boca, normalmente pequenos e frequentemente aos pares. Variáveis nos machos de controlo e nos machos e fêmeas expostos.

F — Tubérculos situados em posição ventral relativamente à zona E. Geralmente pequenos e aos pares. Presentes nos machos de controlo e nas fêmeas expostas a androgénios.

REFERÊNCIAS

- 1) Ankley, G.T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Korte, J.J., Makynen, M.E. (2001). Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 20:1276-1290.
- 2) Ankley, G.T., Jensen, K.M., Makynen, E.A., Kahl, M.D., Korte, J.J., Hornung, M.W., Henry, T.R., Denny, J.S., Leino, R.L., Wilson, V.S., Cardon, M.C., Hartig, P.C., Gray, E.L. (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22:1350-1360.
- 3) Harries, J.E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C.A., Maddix, S., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. (2000). Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.*, 34:3003-3011.

- 4) Jensen, K.M., Korte, J.J., Kahl, M.D., Pasha, M.S., Ankley, G.T. (2001). Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp. Biochem. Physiol.*, C, 128:127-141.
- 5) Kahl, M.D., Jensen, K.M., Korte, J.J., Ankley, G.T. (2001). Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J. Fish. Biol.*, 59:515-523.
- 6) Miles-Richardson, S.R., Kramer, V.J., Fitzgerald, S.D., Render, J.A., Yamini, B., Barbee, S.J., Giesy, J.P. (1999). Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.*, 47:129-145.
- 7) Smith, R.J.F. (1974). Effects of 17 α -methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can. J. Zool.*, 52:1031-1038.

Matriz de localização de tubérculos:

Identificação _____

Data _____

Pontuação total _____

Pontuação

1-presente

2-dilatado

3-saliente

	A	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	B	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	C	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
	D	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

		E	X1	X1	
	F	X1	X1	X1	X1

Apêndice 5B

AVALIAÇÃO DE CARACTERES SEXUAIS SECUNDÁRIOS NO PEIXE-DO-ARROZ-JAPONÊS PARA DETECÇÃO DE DETERMINADOS PRODUTOS QUÍMICOS COM ATIVIDADE ENDÓCRINA

Descreve-se a seguir o protocolo de medição dos processos papilares (*), que constituem os caracteres sexuais secundários do peixe-do-arroz-japonês (*Oryzias latipes*).

- 1) Após excisão do fígado (apêndice 6), coloca-se a carcaça num tubo cônico com 10 ml de formol a 10 %, tamponado a pH neutro (cabeça para cima, cauda para baixo). Se a gónada for fixada numa solução que não seja formol a 10 % tamponado a pH neutro, corta-se a carcaça transversalmente com uma lâmina, entre a região anterior da barbatana anal e o ânus, tendo o cuidado de não lesionar o gonóporo nem a gónada (figura 3). Coloca-se o lado da cabeça do corpo do peixe na solução fixadora, para conservar a gónada, e o lado da cauda em formol a 10 %, tamponado a pH neutro, como se referiu.
- 2) Depois de colocar o corpo do peixe em formol a 10 % tamponado a pH neutro, segura-se a região anterior da barbatana anal com uma pinça e estende-se a barbatana durante cerca de 30 segundos, para a manter aberta. A fim de não lesionar os processos papilares com a pinça, puxa-se a barbatana anal, segurando-a com a pinça numa extensão de alguns raios apenas da região anterior.
- 3) Após manter a barbatana anal aberta durante cerca de 30 segundos, guarda-se o corpo do peixe à temperatura ambiente em formol a 10 %, tamponado a pH neutro, até à medição dos processos papilares (a efetuar depois de um período de fixação mínimo de 24 horas).

Medição

- 1) Depois de fixar o corpo do peixe durante, pelo menos, 24 horas em formol a 10 %, tamponado a pH neutro, retira-se a carcaça do tubo cônico e enxuga-se o formol com papel de filtro ou com um toalhete de papel.
- 2) Coloca-se o peixe com o abdómen para cima e corta-se cuidadosamente a barbatana anal com uma pequena tesoura de dissecação (é preferível cortar a barbatana com uma pequena quantidade de pterigióforo).
- 3) Pega-se na barbatana anal assim cortada com uma pinça, segurando-a pela região anterior, e coloca-se numa lâmina de vidro com algumas gotas de água. Cobre-se a barbatana anal com uma lamela de vidro. Há que ter o cuidado de não lesionar os processos papilares ao pegar na barbatana anal com a pinça.
- 4) Contam-se os segmentos de raio com processos papilares, utilizando um microscópio biológico (vertical ou invertido) e um contador. Reconhece-se um processo papilar pela formação de um pequeno processo visível na margem posterior do segmento de raio. Inscreve-se o número de segmentos com processos papilares em cada raio de barbatana na folha de registo do ensaio (por exemplo: primeiro raio: 0, segundo raio: 10, terceiro raio: 12 etc.) e depois a soma desses números na folha Excel correspondente a cada peixe. Se necessário, fotografa-se a barbatana anal e contam-se na fotografia os segmentos de raio que têm processos papilares.
- 5) Depois das contagens, coloca-se a barbatana anal no tubo cônico referido em 1 e guarda-se o tubo.

(*) Os processos papilares, normalmente, só aparecem em machos adultos e localizam-se nos raios da barbatana anal, entre o segundo e o sétimo ou oitavo raios desta, a contar da sua extremidade posterior (figuras 1 e 2). Aparecem raramente no primeiro raio da barbatana anal, a contar da extremidade posterior desta. Este protocolo normalizado contempla igualmente a medição de processos localizados no primeiro raio da barbatana anal (neste protocolo, o número de ordem dos raios inicia-se na extremidade posterior desta barbatana).

Figura 1

Diferenças entre os sexos na forma e no tamanho da barbatana anal. A: macho; B: fêmea. Oka, T. B. (1931). On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. *J. Fac. Sci., Universidade de Tóquio*, IV, 2:209-218.

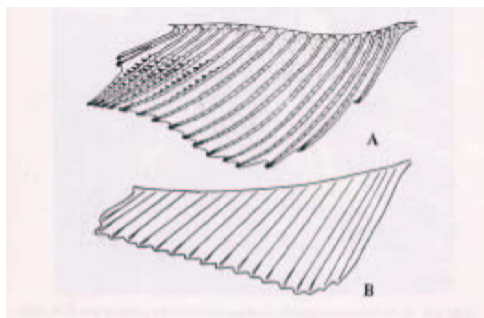


Figura 2

A: processos em segmentos de raios de barbatana anal; J.P.: segmento de raio; A.S.: espaço axial; P.: processo; B: extremidade distal do raio de barbatana. As actinotríquias (Act.) estão assinaladas na extremidade. Oka, T. B. (1931). On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. *J. Fac. Sci., Universidade de Tóquio*, IV, 2:209-218.

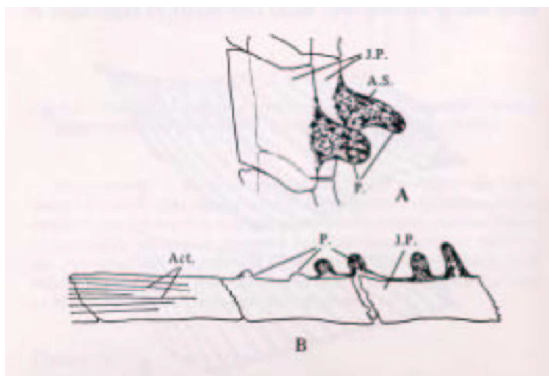
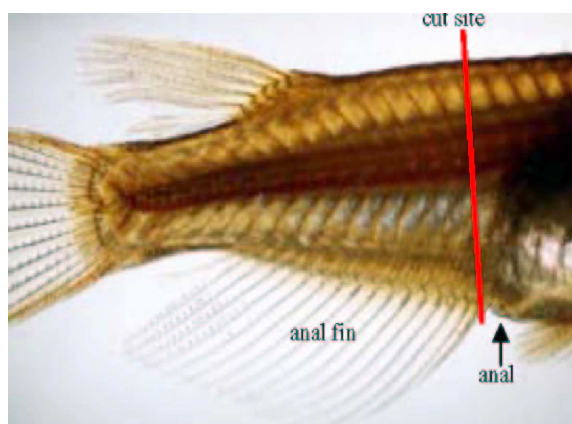


Figura 3

Fotografia do corpo de um peixe mostrando o sítio do corte a efetuar quando a gónada é fixada com uma solução que não seja formol a 10 % tamponado a pH neutro. Nesse caso, separa-se o resto do corpo por meio de um corte com uma lâmina, entre a região anterior da barbatana anal e o ânus (traço vermelho), após o que se coloca a parte do corpo do lado da cabeça na solução fixadora da gónada e a parte do corpo do lado da cauda em formol a 10 %, tamponado a pH neutro.



Apêndice 6

PROTOCOLOS RECOMENDADOS PARA A COLHEITA DE AMOSTRAS DESTINADAS À ANÁLISE DA VITELOGENINA

É necessário tomar precauções para evitar contaminações cruzadas entre amostras de machos e fêmeas para determinação da vitelogenina.

Protocolo 1A: Colheita de sangue na artéria/veia caudal do vairão-de-cabeça-grande

Após anestesia, secciona-se parcialmente o pedúnculo caudal com um bisturi e recolhe-se sangue da veia/artéria caudal num microtubo capilar heparinizado para determinação do hematócrito. Depois de colhido o sangue, separa-se rapidamente o plasma por centrifugação durante 3 minutos a 15 000 g (ou, em alternativa, 15 000 g durante 10 minutos, a 4 °C). Caso se pretenda, pode determinar-se a percentagem de hematócrito depois da centrifugação. Transfere-se o plasma do microtubo capilar para um tubo de centrifugação que já contenha 0,13 unidades de aprotinina (um inibidor de proteases), conservando-o a – 80 °C até à determinação da vitelogenina. A quantidade de plasma depende do tamanho do vairão-de-cabeça-grande e este do sexo do peixe; o volume que pode ser colhido situa-se, em geral, entre 5 e 60 microlitros por peixe (Jensen *et al.*, 2001).

Protocolo 1B: Colheita de sangue no coração do vairão-de-cabeça-grande

Em alternativa, também pode colher-se sangue por punção cardíaca, utilizando uma seringa heparinizada (1000 unidades de heparina por mililitro). Transfere-se o sangue para tubos de Eppendorf (conservados em gelo) e centrifuga-se (7 000 g durante 5 minutos, à temperatura ambiente). Transfere-se o plasma para tubos de Eppendorf limpos (constituindo alíquotas, se o volume de plasma o permitir) e congela-se imediatamente a – 80 °C, até à realização das análises (Panter *et al.*, 1998).

Protocolo 2A: Excisão do fígado no peixe-do-arroz-japonês

Retirada dos peixes das cubas de ensaio

- 1) Retiram-se os peixes das cubas com um pequeno coador de rede, tendo o cuidado de não deixar cair nenhum peixe noutra cuba.
- 2) Em princípio, retiram-se os peixes pela ordem seguinte: cuba de controlo, cuba de controlo do solvente (se for o caso), cuba com a concentração mais baixa, cuba com a concentração intermédia, cuba com a concentração mais elevada e cuba de controlo positivo. Além disso, em cada cuba, retiram-se todos os machos antes de se retirarem as fêmeas.
- 3) Determina-se o sexo de cada peixe com base nos caracteres sexuais secundários externos (por exemplo a forma da barbatana caudal).
- 4) Coloca-se cada peixe num recipiente de transporte e leva-se para a bancada onde se procederá à excisão dos fígados. Verifica-se se a etiqueta aposta no recipiente de transporte é conforme com a etiqueta aposta na cuba de ensaio e confirma-se se o número de peixes removidos da cuba e o número de peixes que nela restam corresponde ao esperado.
- 5) Se não for possível determinar o sexo com base no aspeto físico dos peixes, retiram-se todos os peixes da cuba. Neste caso, determina-se o sexo por exame da gónada ou dos caracteres sexuais secundários ao microscópio estereoscópico.

Excisão do fígado

- 1) Utilizando o pequeno coador de rede, transferem-se os peixes do recipiente de transporte para a solução anestésiante.
- 2) Uma vez os peixes anestesiados, transferem-se para um papel de filtro (ou para um toalhete de papel) com uma pinça de modelo normal. Ao pegar em cada peixe com a pinça, segura-se pela cabeça, para não lhe partir a cauda.
- 3) Enxuga-se a superfície do corpo do peixe com o papel de filtro (ou com o toalhete de papel).

- 4) Coloca-se o peixe com o abdómen para cima. Utilizando uma tesoura de dissecação, faz-se uma pequena incisão transversal na região ventral, entre a base da cabeça e a zona média do abdómen.
- 5) Insere-se a tesoura de dissecação nessa pequena incisão e faz-se outra incisão, ao longo da linha média do abdómen, entre um ponto caudal relativamente aos opérculos branquiais e o lado craniano do ânus. Não inserir a tesoura de dissecação demasiado profundamente, para não lesionar o fígado e a gónada.
- 6) Efetuam-se as operações seguintes, utilizando um microscópio estereoscópico.
- 7) Coloca-se o peixe com o abdómen para cima num toalhete de papel (podendo também ser numa placa de Petri de vidro ou numa lâmina de vidro).
- 8) Afastam-se as paredes da cavidade abdominal com pinças de precisão e expõem-se os órgãos internos. Se necessário, os órgãos internos também podem ser expostos mediante remoção de um dos lados da parede abdominal.
- 9) Utilizando outro par de pinças de precisão, expõe-se a zona de ligação do fígado e da vesícula biliar. Segura-se o canal biliar e faz-se um corte para separar a vesícula biliar, tendo o cuidado de não a romper.
- 10) Segura-se o esófago e separa-se do mesmo modo o aparelho digestivo do fígado, tendo o cuidado de não derramar o conteúdo daquele. Excisa-se do ânus a parte caudal do aparelho digestivo e retira-se o aparelho digestivo da cavidade abdominal.
- 11) Retira-se a massa adiposa e de outros tecidos que rodeiam o fígado, tendo o cuidado de não o lesionar.
- 12) Segura-se a zona portal hepática com pinças de precisão e retira-se o fígado da cavidade abdominal.
- 13) Coloca-se o fígado na lâmina de vidro. Utilizando pinças de precisão, retira-se da superfície do fígado o tecido adiposo e outro que ainda reste (por exemplo tecido da parede abdominal interna).
- 14) Pesa-se o fígado num microtubo de 1,5 ml previamente tarado, numa balança analítica eletrónica. Regista-se a leitura na folha de registo do ensaio (aproximação de 0,1 mg). Confirmam-se as informações identificadoras no rótulo do microtubo.
- 15) Coloca-se a tampa no microtubo que contém o fígado e guarda-se o tubo num suporte refrigerador (ou num suporte gelado).
- 16) Após a excisão de cada fígado, limpam-se os instrumentos de dissecação ou substituem-se estes por instrumentos limpos.
- 17) Retira-se do mesmo modo o fígado a todos os peixes guardados nos recipientes de transporte.
- 18) Uma vez efetuada a excisão do fígado a todos os peixes guardados nos recipientes de transporte (ou seja, a todos os machos ou fêmeas de uma cuba), colocam-se os espécimes hepáticos num suporte de tubos, com uma etiqueta de identificação, e guardam-se no congelador. Se os fígados prosseguirem para o pré-tratamento pouco depois da excisão, levam-se os espécimes para a bancada correspondente num suporte refrigerador (ou num suporte gelado).

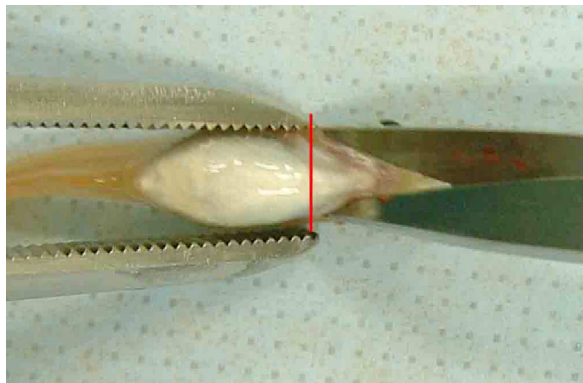
Após a excisão dos fígados, pode proceder-se à histologia das gónadas e à medição dos caracteres sexuais secundários nas carcaças.

Espécimes

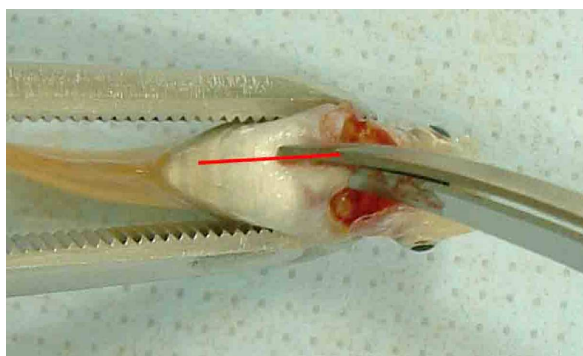
Se não passarem ao pré-tratamento pouco depois da excisão, guardam-se os espécimes de fígado retirados dos peixes a uma temperatura $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

Figura 1

Corte com tesoura em posição imediatamente anterior às barbatanas peitorais.

*Figura 2*

Incisão com tesoura ao longo da linha média abdominal, até um ponto cerca de 2 mm anterior ao ânus.

*Figura 3*

Afastamento das paredes abdominais com uma pinça, de modo a expor o fígado e outros órgãos internos.
(Em alternativa, as paredes abdominais também podem ser afastadas lateralmente e ser mantidas nessa posição com alfinetes.)

A seta indica o fígado.

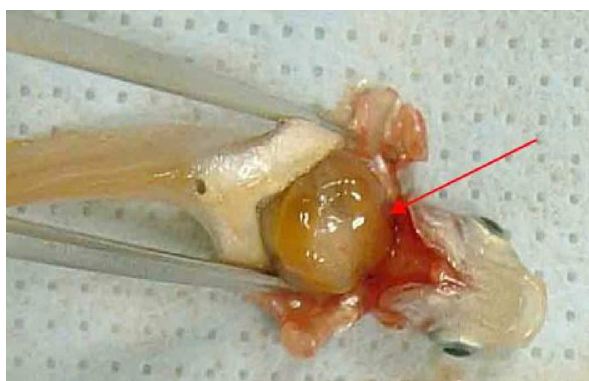
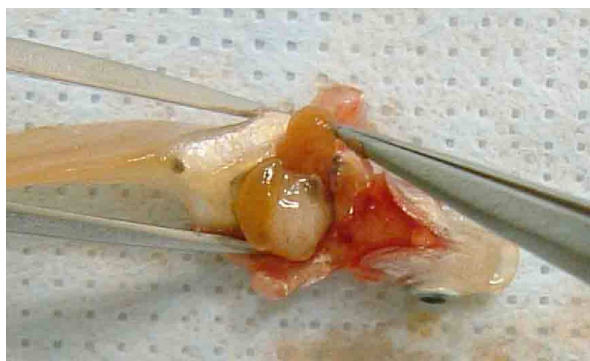
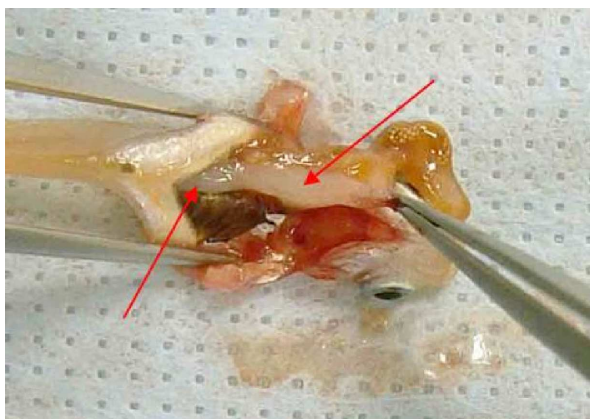


Figura 4

Dissecação e excisão do fígado com uma pinça, sem fazer cortes.

*Figura 5*

Retirada cuidadosa dos intestinos com uma pinça.

*Figura 6*

Corte com tesoura das duas extremidades dos intestinos e das aderências do mesentério.

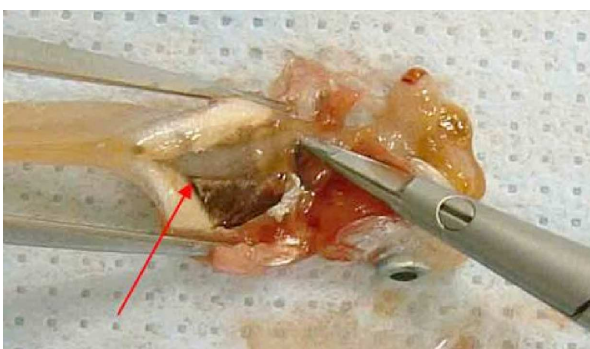


Figura 7 (fêmea)

O procedimento é idêntico para as fêmeas.

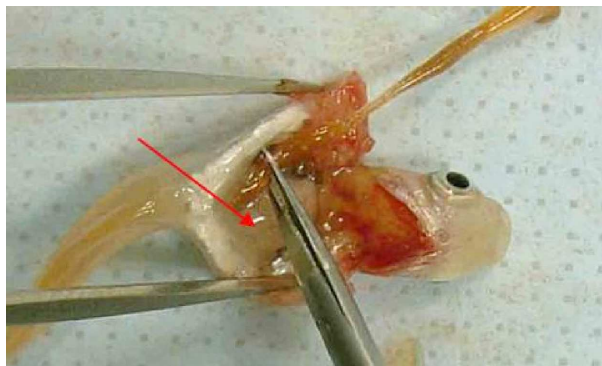
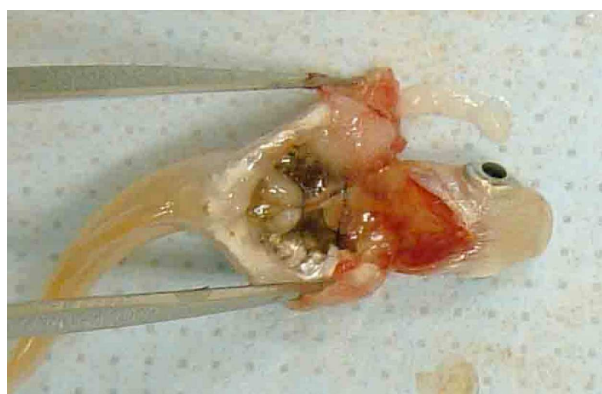


Figura 8

Procedimento concluído.



Protocolo 2B: Pré-tratamento do fígado para análise da vitelogenina no peixe-do-arroz-japonês (*Oryzias latipes*)

Retira-se o frasco de tampão do homogeneizado do kit ELISA e refrigera em gelo moído (temperatura da solução: $\leq 4^{\circ}\text{C}$). Caso se utilize tampão do homogeneizado do sistema ELISA da EnBio, deixa-se descongelar a solução à temperatura ambiente e depois refrigera-se o frasco em gelo moído.

Calcula-se o volume de tampão do homogeneizado para o fígado com base no peso deste (adicionam-se 50 μl de tampão do homogeneizado por miligrama de fígado). Por exemplo, se o fígado pesar 4,5 mg, utilizam-se para o efeito 225 μl de tampão do homogeneizado. Elabora-se uma lista com o volume de tampão do homogeneizado correspondente a cada fígado.

Preparação do fígado para o pré-tratamento

- 1) Imediatamente antes do pré-tratamento, retira-se do congelador o microtubo de 1,5 ml que contém o fígado.
- 2) Para evitar contaminações com vitelogenina, o pré-tratamento dos fígados dos machos deve preceder os das fêmeas. Além disso, procede-se ao pré-tratamento dos vários grupos ensaiados pela ordem seguinte: cuba de controlo, cuba de controlo do solvente (se for o caso), cuba com a concentração mais baixa, cuba com a concentração intermédia, cuba com a concentração mais elevada e cuba de controlo positivo.

- 3) O número de microtubos de 1,5 ml com amostras de fígado retirados do congelador numa dada ocasião não pode exceder o número de tubos que podem ser centrifugados de imediato.
- 4) Colocam-se os microtubos de 1,5 ml com as amostras de fígado no suporte gelado, por ordem de numeração dos espécimes (não é necessário descongelar o fígado).

Pré-tratamento

1) Adição do tampão do homogeneizado

Verifica-se na lista o volume de tampão do homogeneizado a utilizar para a amostra de fígado e regula-se a micropipeta (100-1 000 µl) no volume adequado. Coloca-se uma ponta limpa na micropipeta.

Retira-se tampão do homogeneizado do frasco onde está guardado e adiciona-se ao microtubo de 1,5 ml que contém a amostra de fígado.

Procedendo do mesmo modo, adiciona-se tampão do homogeneizado a todos os microtubos de 1,5 ml que contém as amostras de fígado. Não é necessário substituir a ponta da micropipeta, a menos que fique contaminada ou disso se suspeite.

2) Homogeneização do fígado

- Fixa-se um novo pilão de homogeneização no homogeneizador do microtubo.
- Insere-se o pilão no microtubo de 1,5 ml. Segura-se o homogeneizador do microtubo e comprime-se o fígado entre a superfície do pilão e a parede interna do microtubo.
- Faz-se funcionar o homogeneizador do microtubo durante 10 a 20 segundos. Durante esta operação, mantém-se o microtubo de 1,5 ml refrigerado em gelo moído.
- Retira-se o pilão do microtubo e deixa-se este em repouso durante cerca de 10 segundos. Em seguida, avalia-se visualmente o estado da suspensão.
- Caso se detetem fragmentos de fígado na suspensão, repetem-se as operações 3 e 4 para obter um homogeneizado de fígado satisfatório.
- Mantém-se a suspensão de homogeneizado de fígado no suporte gelado até à centrifugação.
- É necessário utilizar um pilão novo para cada homogeneizado.
- Homogeneizam-se todos os fígados com tampão do homogeneizado conforme se descreveu.

3) Centrifugação da suspensão de homogeneizado hepático

- Confirma-se que a temperatura da câmara de centrifugação refrigerada é $\leq 5^{\circ}\text{C}$.
- Introduzem-se os microtubos de 1,5 ml com a suspensão de homogeneizado hepático na câmara de centrifugação refrigerada (se necessário, reequilibra-se).
- Centrifuga-se a suspensão de homogeneizado hepático a 13 000 g durante 10 minutos, a uma temperatura $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Se os sobrenadantes se separarem convenientemente, a força centrífuga e o tempo de centrifugação podem, se necessário, ser ajustados.
- Após a centrifugação, verifica-se se os sobrenadantes se separaram convenientemente (superfície: lípidos; camada intermédia: sobrenadante; camada inferior: tecido hepático). Se a separação não for adequada, procede-se a nova centrifugação da suspensão nas mesmas condições.
- Retiram-se todos os espécimes da câmara de centrifugação refrigerada e dispõem-se no suporte gelado por ordem de numeração dos espécimes. Há que ter cuidado para, depois da centrifugação, não ressuspender as camadas separadas.

4) Recolha do sobrenadante

- Colocam-se num suporte de tubos quatro microtubos de 0,5 ml para recolha de sobrenadante.
- Utilizando a micropipeta, retiram-se 30 µl de um dos sobrenadantes (fase intermédia separada) e transferem-se para um dos microtubos de 0,5 ml. Há que ter cuidado para não recolher lípidos da camada superior nem tecido hepático da camada inferior.
- Procedendo do modo descrito, transfere-se mais sobrenadante para dois outros microtubos de 0,5 ml.
- Recolhe-se o resto do sobrenadante com a micropipeta (se possível, ≥ 100 µl) e transfere-se para o último microtubo de 0,5 ml. Há que ter cuidado para não recolher lípidos da camada superior nem tecido hepático da camada inferior.
- Tapam-se os microtubos de 0,5 ml e escreve-se o volume de sobrenadante no rótulo respetivo. Refrigeram-se imediatamente os microtubos no suporte gelado.
- Substitui-se a ponta da micropipeta para cada sobrenadante. Caso fique agarrada à ponta da micropipeta uma grande quantidade de lípidos, substitui-se imediatamente a ponta, para evitar a contaminação do extrato de fígado com gorduras.
- Transfere-se todo o sobrenadante centrifugado para quatro microtubos de 0,5 ml, conforme se descreveu.
- Uma vez transferido todo o sobrenadante, colocam-se os microtubos de 0,5 ml, com rótulo identificador, num suporte de tubos, que vai imediatamente para o congelador. Se a determinação das concentrações de vitelogenina decorrer logo a seguir ao pré-tratamento, coloca-se um dos microtubos de 0,5 ml (com 30 µl de sobrenadante) num suporte de tubos refrigerado e leva-se esse microtubo para a bancada onde irá realizar-se o ensaio ELISA. Nesse caso, colocam-se os outros microtubos noutro suporte de tubos, que vai para o congelador.
- Uma vez recolhido o sobrenadante, eliminam-se adequadamente os resíduos.

Conservação dos espécimes

Até serem utilizados no método ELISA, conservam-se os microtubos de 0,5 ml que contêm o sobrenadante do homogeneizado hepático a uma temperatura ≤ -70 °C.

Protocolo 3A: Colheita de sangue na artéria/veia caudal do peixe-zebra

Imediatamente após a anestesia, corta-se transversalmente o pedúnculo caudal e colhe-se sangue da artéria/veia caudal para um microtubo capilar heparinizado para determinação do hematócrito. O volume de sangue depende do tamanho do peixe, variando entre 5 e 15 µl. Adiciona-se ao microtubo capilar volume idêntico de tampão aprotinina (6 µg/ml em tampão fosfato, PBS) e separa-se o plasma do sangue por centrifugação (5 minutos a 600 g). Transfere-se o plasma para tubos de ensaio, que se conservam a -20 °C até à determinação analítica da vitelogenina ou de outras proteínas relevantes.

Protocolo 3B: Colheita de sangue por punção cardíaca no peixe-zebra

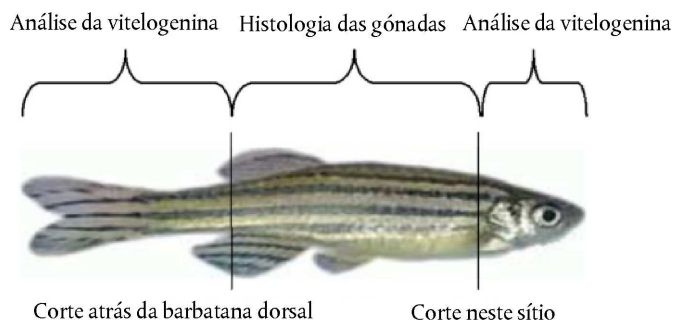
Para evitar a coagulação do sangue e a degradação proteica, colhem-se as amostras numa solução de tampão fosfato (PBS) com 1 000 unidades de heparina por mililitro e 2 TIU (unidades de inibidor da tripsina) por mililitro do inibidor das proteases aprotinina. Recomenda-se a utilização de heparina (sal de amónio) e de aprotinina liofilizada, como ingredientes do tampão. Para colher as amostras, recomenda-se a utilização de seringas (de 1 ml) com agulha fina fixa (por exemplo Braun Omnikan-F). Enchem-se previamente as seringas com tampão (aproximadamente 100 µl), para eluir completamente os pequenos volumes de sangue colhidos em cada peixe. Colhem-se as amostras de sangue por punção cardíaca. Começa-se por anestesiá-lo com MS-222 (100 mg/l). Um plano de anestesia correto permitirá ao utilizador distinguir o batimento cardíaco do peixe-zebra. Ao efetuar a punção cardíaca, a depressão exercida pelo pistão da seringa deve ser ligeira. O volume de sangue que pode ser recolhido situa-se entre 20 e 40 microlitros. Após a punção cardíaca, transfere-se a mistura de sangue e tampão para um tubo de ensaio. Separa-se o plasma do resto do sangue por centrifugação (20 minutos a 5 000 g) e conserva-se o plasma a -80 °C até às análises.

Protocolo 3C: Procedimento normalizado de homogeneização da cabeça e da cauda do peixe-zebra

1. Anestesia-se e eutanasia-se cada peixe conforme consta da descrição do ensaio.
2. Cortam-se a cabeça e a cauda de cada peixe como ilustrado na figura 1.

Importante: Para evitar que machos não-induzidos sejam contaminados por vitelogenina proveniente de fêmeas ou de machos induzidos, é necessário lavar e limpar corretamente (por exemplo com etanol a 96 %) os instrumentos de dissecação e a placa de corte, antes de passar ao peixe seguinte.

Figura 1



3. Pesa-se com aproximação de 1 mg o conjunto da cabeça e da cauda de cada peixe.
4. Após a pesagem, colocam-se ambas as partes em tubos adequados (por exemplo tubos de Eppendorf de 1,5 ml) e congela-se a -80°C , até à homogeneização, ou procede-se a homogeneização imediata sobre gelo com dois pilões de plástico. (Podem ser utilizados outros métodos, se se realizarem sobre gelo e deles resultar uma massa homogénea). Importante: É necessário numerar corretamente os tubos, a fim de que a cabeça e a cauda de cada peixe possam ser relacionadas com o resto do corpo correspondente, utilizado na histologia das gónadas.
5. Uma vez homogeneizada a massa, adiciona-se uma quantidade de **tampão de homogeneização (*)** gelado, correspondente a quatro vezes o peso dos tecidos. A mistura deve continuar a ser homogeneizada com os pilões até o estar completamente. Nota importante: É necessário utilizar pilões novos para cada peixe.
6. Colocam-se as amostras em gelo até à centrifugação a 4°C , durante 30 minutos, a 50 000 g.
7. Por meio de uma pipeta, transferem-se volumes de 20 μl do sobrenadante para, **pelo menos, dois** tubos, mergulhando para o efeito a ponta da pipeta através da camada superficial lipídica e aspirando cuidadosamente sobrenadante sem resíduos da fração lipídica nem da camada depositada.
8. Armazenam-se os tubos a -80°C até serem utilizados.

(*) Tampão de homogeneização:

— (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; 1 % da mistura de inibidores de proteases da Sigma): 12 ml de Tris-HCl, pH 7,4, + 120 μl da mistura de inibidores de proteases.

— TRIS: TRIS-ULTRAPURO (ICN), por exemplo da Bie & Berntsen, Dinamarca.

— Mistura de inibidores de proteases: da Sigma, para tecidos de mamíferos (n.º de produto P8340).

NOTA: O tampão de homogeneização tem de ser utilizado no próprio dia de preparação e de ser mantido em gelo durante esse período.

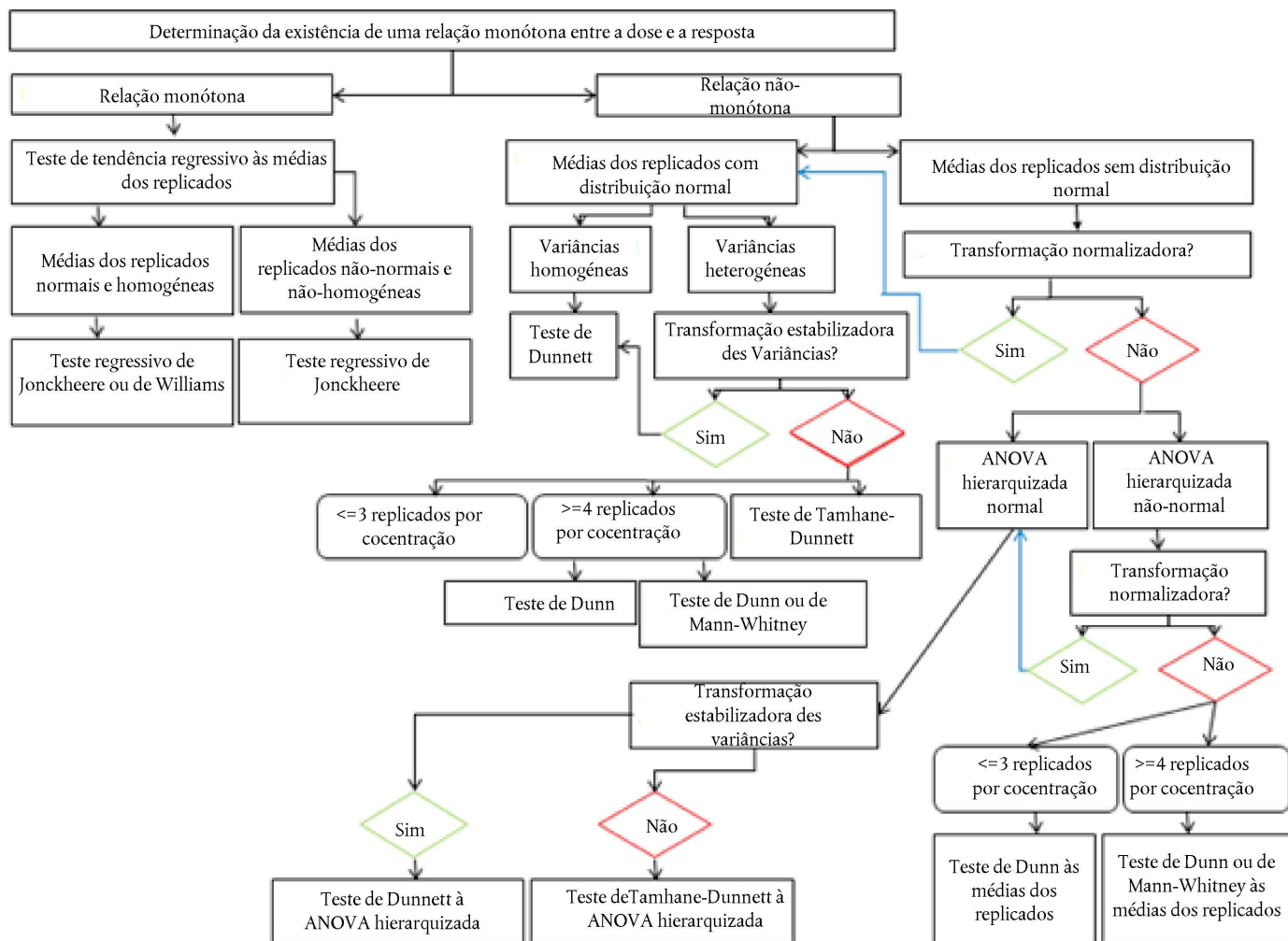
*Apêndice 7***AMOSTRAS ENRIQUECIDAS COM VITELOGENINA E PADRÃO DE REFERÊNCIA INTERNO**

Em cada dia em que se realizem determinações da vitelogenina, analisa-se uma amostra enriquecida com um padrão de referência interno. Na preparação do padrão de referência interno, é necessário utilizar vitelogenina de um lote diferente do utilizado na preparação dos padrões de calibração para o ensaio em curso.

Prepara-se a amostra enriquecida adicionando uma quantidade conhecida do padrão interno a uma amostra de plasma de machos de controlo. Enriquece-se a amostra de modo a obter uma concentração de vitelogenina 10 a 100 vezes maior do que a concentração de vitelogenina esperada nos peixes machos de controlo. A amostra de plasma de machos de controlo a enriquecer pode provir de um só peixe ou ser composta a partir de vários peixes.

Analisa-se uma subamostra de plasma de machos de controlo não-enriquecido em, pelo menos, dois alvéolos duplicados. Analisa-se a amostra enriquecida igualmente em, pelo menos, dois alvéolos duplicados. A fim de determinar uma concentração esperada, adiciona-se a quantidade média de vitelogenina determinada nas duas amostras de plasma de machos de controlo não-enriquecido à quantidade (calculada) de vitelogenina adicionada para enriquecer as amostras. Juntamente com os resultados de cada série de ensaios realizados no dia, indica-se no relatório a relação entre esta concentração esperada e a concentração medida correspondente.

FLUXOGRAMA DE DECISÃO PARA A ANÁLISE ESTATÍSTICA



C.49 Ensaio de toxicidade aguda em embriões de peixes (FET)

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 236 (2013) da OCDE. Descreve um ensaio de toxicidade aguda em embriões de peixe (FET) com o peixe-zebra (*Danio rerio*). O ensaio é concebido para determinar a toxicidade aguda de produtos químicos em fases embrionárias de peixes. O ensaio FET baseia-se em estudos e atividades de validação com peixe-zebra (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14). Tem sido aplicado com êxito a uma vasta gama de produtos químicos com diferentes modos de ação, solubilidade, volatilidade e hidrofobicidade (revisto em 15 e 16).
2. No apêndice 1 definem-se alguns conceitos utilizados neste método de ensaio.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

3. Ovos de peixe-zebra recentemente fertilizados são expostos ao produto químico de ensaio durante 96 horas. A cada 24 horas, até quatro observações apicais são registadas como indicadores de letalidade (6): (i) coagulação de ovos fertilizados, (ii) falta de formação dos somitos, (iii) falta de separação da cauda embrionária do saco vitelino, e (iv) ausência de batimentos cardíacos. No final do período de exposição, a toxicidade aguda é determinada com base num resultado positivo em qualquer uma das quatro observações apicais registadas, e é calculada a CL_{50} .

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

4. As informações úteis sobre as propriedades específicas das substâncias são a fórmula estrutural, o peso molecular, o grau de pureza, a estabilidade em água e à luz, o pK_a , o K_{ow} , a solubilidade em água e a pressão de vapor, bem como os resultados de um ensaio de biodegradabilidade «fácil» (método de ensaio C.4 (17) ou C.29 (18)). A hidrossolubilidade e a pressão de vapor podem ser utilizadas para calcular a constante da Lei de Henry, o que permitirá verificar a ocorrência de perdas por evaporação da substância em estudo. Deve ser possível utilizar um método analítico fiável para a quantificação da substância nas soluções do ensaio, cuja exatidão e limite de deteção sejam conhecidos e se encontrem descritos.
5. Se o método de ensaio for utilizado para testar uma mistura, devem fornecer-se dados suficientes sobre a composição desta, nomeadamente a identidade química dos seus componentes, a ocorrência quantitativa destes e as suas propriedades específicas (ver ponto 4). Antes da utilização do método de ensaio para ensaios regulamentares de uma mistura, deve considerar-se se serão fornecidos resultados aceitáveis para efeitos de regulamentação.
6. No que diz respeito às substâncias que podem ser ativadas através do metabolismo, há provas de que os embriões de peixe-zebra possuem capacidades de biotransformação (19) (20) (21) (22). No entanto, a capacidade metabólica dos embriões de peixes nem sempre é semelhante à dos juvenis ou dos peixes adultos. Por exemplo, o álcool alílico protóxico (9) não foi respeitado pelo FTE. Por conseguinte, se existirem indicações de que metabolitos ou outros produtos de transformação podem ser mais tóxicos do que o composto parental, recomenda-se também a realização do ensaio com estes metabolitos/produtos de transformação e a utilização destes resultados nas conclusões sobre a toxicidade do produto químico em estudo ou, em alternativa, efetuar um novo ensaio que tenha em consideração o metabolismo.
7. Não é de prever que os embriões sejam sensíveis a substâncias de peso molecular ≥ 3 kDa, de estrutura molecular muito volumosa ou que provocam atrasos na eclosão suscetíveis de evitar ou reduzir a exposição após a eclosão, devido a restrições de biodisponibilidade da substância, podendo ser mais adequados outros ensaios de toxicidade.

VALIDADE DO ENSAIO

8. Para que os resultados do ensaio possam considerar-se válidos, têm de ser cumpridos os seguintes critérios:
 - a) A taxa de fertilização global de todos os ovos recolhidos deve ser ≥ 70 % no lote testado.

- b) Em qualquer momento do ensaio, a temperatura da água nas câmaras de ensaio deve ser mantida a 26 ± 1 °C.
- c) A taxa de sobrevivência global de embriões no controlo negativo (água destilada), e, se for caso disso, no controlo do solvente, deve ser ≥ 90 % até ao final do período de 96 horas de exposição.
- d) A exposição ao controlo positivo (por exemplo, 4,0 mg/l de 3,4-dicloroanilina para peixe-zebra) deverá ter como resultado um mínimo de 30 % de mortalidade no final do período de 96 horas de exposição.
- e) A taxa de eclosão no controlo negativo (e controlo do solvente, se for caso disso) deve ser ≥ 80 % no final do período de 96 horas de exposição.
- f) No final do período de 96 horas de exposição, a concentração de oxigénio dissolvido no controlo negativo e a concentração mais elevada do ensaio devem ser ≥ 80 % de saturação.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

9. O apêndice 2 apresenta uma panorâmica geral das recomendações de manutenção e condições do ensaio.

Material e aparelhagem

10. O seguinte equipamento é necessário:

- a) Tanques de um material quimicamente inerte (vidro, por exemplo) e de capacidade adequada à carga e à densidade de ocupação recomendadas (ver «Manutenção de peixes reprodutores» apêndice 14);
- b) Microscópio invertido e/ou binocular com capacidade de ampliação de, pelo menos, 80 vezes. Se a temperatura da sala de registo das observações não puder ser ajustada para 26 ± 1 °C, é necessário recorrer a uma fase de temperatura controlada com circulação cruzada, ou a outros métodos, para manter a temperatura;
- c) Câmaras de ensaio; p. ex., placas-padrão de 24 poços, com uma profundidade de aproximadamente 20 mm (ver «Câmaras de ensaio» n.º 11);
- d) Por exemplo, películas autocolantes para cobrir as placas de 24 poços;
- e) Incubadora ou sala climatizada com controlo de temperatura, que permita manter esta última a 26 ± 1 °C nos poços (ou câmaras de ensaio);
- f) Medidor de pH;
- g) Medidor de oxigénio;
- h) Equipamento para a determinação da dureza da água e condutividade;
- i) Placa de desova: tabuleiros de instrumentos de vidro, aço inoxidável ou de outras matérias inertes; malha de arame (dimensões da rede $2 \pm 0,5$ mm) de aço inoxidável ou de outro material inerte para proteger os ovos uma vez postos; substrato de desova — por exemplo, plantas de imitação de material inerte — método de ensaio C.48, apêndice 4A (23);
- j) Pipetas com aberturas alargadas para a recolha de ovos;
- k) Recipientes de vidro para preparar diferentes concentrações de ensaio e água de diluição (copos, balões volumétricos, provetas graduadas e pipetas graduadas) ou para recolher os ovos de peixe-zebra (por exemplo, copos, placas de cristalização);
- l) Se forem utilizados sistemas de exposição alternativos, como o fluxo contínuo (24) ou a dosagem passiva (25), para a realização do ensaio, são necessárias instalações e equipamento adequados.

Câmaras de ensaio

11. Devem ser utilizadas câmaras de ensaio de vidro ou poliestireno (p. ex., placas de 24 poços, com uma capacidade de 2,5 a 5 ml por poço). Em caso de suspeita de adsorção ao poliestireno (p. ex., no caso de substâncias apolares, planas com elevada K_{ow}), devem utilizar-se materiais inertes (vidro) para reduzir as perdas por adsorção (26). As câmaras de ensaio devem ser posicionadas de forma aleatória na incubadora.

Água e condições de ensaio

12. Recomenda-se diluir a água de manutenção para alcançar níveis de dureza típicos de uma grande variedade de águas de superfície. A água de diluição deve ser preparada a partir de água reconstituída (27). O consequente grau de dureza deve ser equivalente a 100-300 mg/l CaCO_3 , de modo a evitar a precipitação excessiva de carbonato de cálcio. Podem utilizar-se outras águas de superfície ou de poços, bem caracterizadas. A água reconstituída pode ser adaptada a água de manutenção de baixa dureza, por diluição com água desionizada até um rácio de 1:5 e uma dureza mínima de 30-35 mg/l CaCO_3 . Antes da adição do produto químico em estudo, a água é arejada, até à saturação, com oxigénio. A temperatura nos poços deve ser mantida a 26 ± 1 °C, ao longo do ensaio. Durante o ensaio, o pH deve estar compreendido entre 6,5 e 8,5 e, nesse intervalo, não variar mais do que 1,5 unidades. Se o pH não se mantém neste intervalo, deve ser ajustado antes do início do ensaio. O ajustamento do pH deve ser efetuado de modo a não alterar de forma significativa a concentração da solução-padrão, nem causar qualquer reação química ou precipitação da substância em estudo. Recomenda-se a utilização de cloreto de hidrogénio (HCl) e de hidróxido de sódio (NaOH) para corrigir o pH nas soluções contendo o produto químico de ensaio.

Soluções utilizadas nos ensaios

13. As soluções utilizadas nos ensaios com as concentrações escolhidas podem ser preparadas, por exemplo, por diluição de uma solução-padrão. A solução-padrão deve ser preparada, preferencialmente, por simples mistura ou agitação da substância de ensaio na água de diluição, utilizando meios mecânicos (agitação e dispersão ultrassónica, por exemplo). Caso seja difícil dissolver o produto químico de ensaio em água, procede-se como é descrito no *Guidance Document* n.º 23 da OCDE, relativo à manipulação de substâncias e misturas difíceis (28). Deve evitar-se a utilização de solventes, embora estes possam ser necessários em alguns casos, para obter uma solução-padrão com a concentração adequada. Caso se utilize um solvente para facilitar a preparação de soluções-padrão, a sua concentração final não deve exceder 100 µl/l e deve ser a mesma em todos os recipientes de ensaio. Quando se utiliza um solvente, é necessário um controlo suplementar deste.

Manutenção dos peixes reprodutores

14. Para a produção de ovos, utiliza-se um lote de criação não exposto de peixe-zebra de tipo selvagem, com taxa de fertilização dos ovos bem documentada. Os peixes devem estar livres de sintomas macroscopicamente perceptíveis de infeção e doença, e não devem ter sido submetidos a tratamentos farmacêuticos (agudos ou profiláticos) durante 2 meses antes da desova. Os peixes reprodutores são mantidos em aquários com uma capacidade de carga recomendada de 1 l de água por peixe e um fotoperíodo fixo de 12-16 horas (29) (30) (31) (32) (33). Devem ajustar-se as taxas de filtragem otimizadas e evitar-se taxas de filtragem excessivas, que provocam elevados níveis de perturbação da água. Para as condições de alimentação, ver o apêndice 2. Deve evitar-se a alimentação excessiva; a limpeza e qualidade da água dos aquários deve ser controlada periodicamente e, se necessário, ser reinicializada para o estado inicial.

Ensaio de competência

15. O produto químico de referência, 3,4-dicloroanilina (utilizada nos estudos de validação (1) (2)), deve ser testada, de preferência, duas vezes por ano, num intervalo de concentração-resposta completo, para verificar a sensibilidade da estirpe de peixe utilizada. Os laboratórios que comecem a utilizar este ensaio devem utilizar os produtos químicos de referência. Um laboratório pode utilizar este produto químico para demonstrar a sua competência técnica na execução do ensaio antes de apresentar os resultados obtidos para efeitos de regulação.

Produção de ovos

16. Os ovos de peixe-zebra podem ser produzidos através de grupos de reprodutores (em tanques individuais de desova) ou por meio de desova massiva (em tanques de manutenção). No caso de grupos de reprodutores, colocam-se machos e fêmeas (p. ex., num rácio de 2:1), de um grupo de reprodução em tanques de desova algumas horas antes do início da fase escura do dia anterior ao ensaio. Uma vez que os grupos de reprodutores de peixe-zebra podem, ocasionalmente, não conseguir reproduzir-se, é recomendado utilizar-se paralelamente, pelo menos, três tanques de desova. Para evitar distorções estatísticas de cariz genético, os ovos são recolhidos de, pelo menos, três grupos de reprodução, misturados e selecionados aleatoriamente.
17. Para a recolha de ovos, são colocadas placas de desova em tanques de desova ou em tanques de manutenção antes da fase escura do dia anterior ao ensaio, ou antes do início da fase de luz no dia da realização do ensaio. Para impedir a predação de ovos pelos peixe-zebra adultos, as placas de desova são cobertas com rede de malhas de material inerte de dimensão adequada (aproximadamente $2 \pm 0,5$ mm). Se for considerado necessário, podem ser fixadas à rede plantas artificiais de material inerte (p. ex., plástico ou vidro), para estimular a reprodução (3) (4) (5) (23) (35). Devem utilizar-se materiais de plástico resistentes que não contaminem (p. ex., ftalatos). O acasalamento, a desova e a fertilização ocorrem num período de 30 minutos após o início da fase de luz; as placas de desova com os ovos recolhidos podem ser removidos com cuidado. A lavagem dos ovos com água reconstituída depois de estes terem sido recolhidos das placas de desova é recomendada.

Diferenciação dos ovos

18. A 26 °C, os ovos fertilizados passam pela primeira clivagem após cerca de 15 minutos e as clivagens sincronizadas consecutivas formam 4, 8, 16 e 32 células blastómeros (ver apêndice 3) (35). Nestas fases, os ovos fertilizados podem ser claramente identificados, através do desenvolvimento de uma blástula.

PROCEDIMENTO

Condições de exposição

19. Vinte embriões por concentração (um embrião por poço) são expostos ao produto químico de ensaio. A exposição deve ser feita de maneira a que ± 20 % da concentração nominal do produto químico seja mantida durante todo o ensaio. Se isso não for possível num sistema estático, deve utilizar-se um intervalo de renovação semiestático manejável (por exemplo, renovação a cada 24 horas). Nestes casos, importa verificar as concentrações de exposição, no mínimo, nos tratamentos com maior e menor concentração, no início e no final de cada período de exposição (ver ponto 36). Se não puder ser mantida uma concentração de exposição de ± 20 % da concentração nominal, todas as concentrações devem ser medidas no início e no final de cada período de exposição (ver ponto 36). No momento da renovação, é necessário tomar precauções para que os embriões continuem submersos por uma pequena quantidade de solução de ensaio usada, de forma a evitar a sua secagem. O planeamento do ensaio pode ser adaptado de forma a cumprir requisitos de ensaio de substâncias específicas — p. ex., fluxo contínuo (24) ou sistemas de dosagem passivas (25) para substâncias facilmente degradáveis ou altamente adsorvíveis (29), ou outros para substâncias voláteis (36) (37). Em qualquer caso, é necessário tomar precauções para reduzir ao mínimo o stress dos embriões. Antes do início do ensaio, as câmaras de ensaio devem ser acondicionadas durante, pelo menos, 24 horas com as soluções de ensaio. As condições de ensaio são resumidas no apêndice 2.

Concentrações de ensaio

20. Para cumprir os requisitos estatísticos são necessárias, normalmente, cinco concentrações da substância de ensaio espaçadas por um fator constante não superior a 2,2. Caso se utilizem menos de cinco concentrações, deve apresentar-se uma justificação. A concentração mais elevada do ensaio deveria resultar, de preferência, em 100 % de letalidade; por seu turno, a concentração mais baixa não ter efeitos observáveis, como definido no ponto 28. Um ensaio de determinação da gama de concentrações antes do ensaio definitivo permite seleccionar a gama de concentrações adequada. A gama de concentrações geralmente utilizada é de dez embriões por concentração. As seguintes instruções referem-se à realização do ensaio em placas de 24 poços. Se forem utilizadas diferentes câmaras de ensaio (p. ex., placas de Petri pequenas) ou forem testadas mais concentrações, as instruções devem ser alteradas em conformidade.

21. O ponto 27 e o apêndice 4 contêm informações e instruções visuais para a atribuição das concentrações em placas de 24 poços.

Grupos de controlo

22. São necessários controlos de água de diluição, tanto como controlo negativo como controlo interno da placa. Se se observar mais de 1 embrião morto no controlo interno da placa, essa placa é rejeitada, reduzindo, assim, o número de concentrações utilizadas para determinar o valor de CL_{50} . Se uma placa inteira for rejeitada, a capacidade para avaliar e determinar os efeitos observados pode tornar-se mais difícil, especialmente se se tratar da placa de controlo do solvente ou de uma placa em que os embriões tratados também são afetados. No primeiro caso, o ensaio deve ser repetido. No segundo caso, a perda, na totalidade, de um ou mais grupos de tratamento devido à mortalidade no controlo interno pode limitar a capacidade para avaliar os efeitos e determinar os valores de CL_{50} .
23. Para cada lote de ovos utilizados no ensaio, é realizado um controlo positivo com uma concentração fixa de 4 mg/l de 3,4-dicloroanilina.
24. Caso se utilize um solvente, um grupo extra de 20 embriões é exposto ao mesmo numa placa à parte de 24 poços, servindo assim como amostra de controlo do solvente. Para considerar o ensaio aceitável, deve demonstrar-se que o solvente não têm efeitos significativos sobre o tempo de eclosão e sobrevivência, nem produz quaisquer outros efeitos nocivos sobre os embriões (ver ponto 8c).

Início da exposição e a duração do ensaio

25. O ensaio é iniciado o mais rapidamente possível após a fertilização dos ovos e terminado após as 96 horas de exposição. Os embriões devem ser imersos na solução de ensaio antes do início da clivagem do blastodisco ou, o mais tardar, na fase de 16 células. Para iniciar a exposição com atraso mínimo, é necessário, pelo menos, duplicar o número de ovos em cada grupo de tratamento, selecionando-os aleatoriamente e transferindo-os para as respetivas concentrações e controlos (por exemplo, em placas de cristalização de 100 ml; os ovos devem estar completamente submersos), o mais tardar, 90 minutos após a fertilização.
26. Os ovos fertilizados viáveis devem ser separados dos ovos não fertilizados e transferidos para placas de 24 poços pré-acondicionadas durante 24 horas e enchidas novamente com 2 ml de soluções de ensaio novas, no prazo de 180 minutos após a fertilização. Por estereomicroscopia (de preferência com ampliação ≥ 30 vezes), selecionam-se os ovos fertilizados num processo de clivagem, sem irregularidades visíveis durante a clivagem (por exemplo, assimetria, formação da vesícula) nem lesões no coriön. Para a recolha e separação dos ovos, ver apêndice 3, figura 1 e 3 e apêndice 4, figura 2.

Distribuição dos ovos nas placas de 24 poços

27. Os ovos são distribuídos pelas placas nas seguintes quantidades (ver também o anexo 4, fig. 1)
- 20 ovos numa placa para cada concentração de ensaio;
 - 20 ovos numa placa como controlo do solvente (se necessário);
 - 20 ovos numa placa como controlo positivo;
 - 4 ovos em água de diluição como controlo interno da placa em cada uma das placas anteriores;
 - 24 ovos em água de diluição numa placa como controlo negativo.

Observações

28. As observações apicais realizadas em cada embrião testado incluem o seguinte: coagulação dos embriões, ausência de formação dos somitos, não separação da cauda e ausência de batimentos cardíacos (quadro 1). Estas observações são utilizadas para a determinação de letalidade: qualquer resultado positivo numa destas observações significa que o embrião de peixe-zebra está morto. Além disso, regista-se a eclosão diariamente nos grupos de tratamento e controlo a partir das 48 horas. As observações são registadas a cada 24 horas, até ao final do ensaio.

Quadro 1

Observações apicais da toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra 24-96 horas após a fertilização.

	Tempos de exposição			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Embriões coagulados	+	+	+	+
Ausência de formação dos somitos	+	+	+	+
Não separação da cauda	+	+	+	+
Ausência de batimentos cardíacos		+	+	+

29. *Coagulação do embrião*: Os embriões coagulados têm uma coloração branca leitosa e são escuros na visualização ao microscópico (ver apêndice 5, fig. 1). O número de embriões coagulados é determinado após 24, 48, 72 e 96 horas.
30. *Ausência de formação dos somitos*: A 26 ± 1 °C, formaram-se cerca de 20 somitos após 24 horas (ver apêndice 5, figura 2) em embriões de peixe-zebra com desenvolvimento normal. Um embrião normalmente desenvolvido exibe movimentos espontâneos (contrações lado a lado). Os movimentos espontâneos indicam a formação de somitos. A ausência de somitos é registada após 24, 48, 72 e 96 horas. A não formação de somitos pode dever-se a um atraso geral no desenvolvimento. O mais tardar até 48 horas, deverá observar-se a formação de somitos. Se não for o caso, os embriões são considerados mortos.
31. *Ausência de separação da cauda*: Em embriões de peixe-zebra com desenvolvimento normal, observa-se a separação da cauda (ver apêndice 5, figura 3) a partir do saco vitelino após o último alongamento do embrião. A ausência de separação da cauda é registada após 24, 48, 72 e 96 horas.
32. *Ausência de batimentos cardíacos*: Em embriões de peixe-zebra com desenvolvimento normal a 26 ± 1 °C, os batimentos cardíacos são visíveis após 48 horas (ver apêndice 5, figura 4). Deve ter-se um cuidado especial quando se regista este parâmetro, uma vez que batimento cardíaco irregular (errático) não deve ser registado como letal. Além disso, batimento cardíaco visível sem circulação na aorta abdominal é considerado não-letal. Para registar este parâmetro, os embriões não apresentem batimento cardíaco devem ser observados numa ampliação mínima de 80 x durante, pelo menos, um minuto. A ausência de batimento cardíaco é registada após 48, 72 e 96 horas.
33. As taxas de incubação de todos os grupos de tratamentos e de controlo devem ser registadas a partir das 48 horas, e descritas no relatório. Embora a incubação não seja um parâmetro utilizado para o cálculo da CL_{50} , assegura a exposição do embrião sem uma potencial função de barreira do coriön, e, como tal, pode auxiliar na interpretação dos resultados.
34. Os apêndices 3 e 5 contêm descrições pormenorizadas do desenvolvimento normal (35) e exemplos do desenvolvimento anormal de embriões de peixe-zebra.

Determinações analíticas

35. No início e no final do ensaio, medem-se o pH, a dureza total e a condutividade no(s) grupo(s) controlo(s) e na maior concentração do produto químico de ensaio. Em sistemas de renovação semiestático, o pH deve ser medido antes e depois da renovação da água. A concentração de oxigénio dissolvido é medida no final do ensaio nos controlos negativos e no tratamento com concentração de ensaio mais elevada com embriões viáveis, os quais devem ser conformes com os critérios de validade do ensaio (ver ponto 8, alínea f). Se houver a temperatura puder variar entre as placas de 24 poços, a dev ser medida em três recipientes selecionados aleatoriamente. Durante o ensaio, a temperatura deve ser registada, de preferência, continuamente ou, no mínimo, diariamente.
36. Num sistema estático, a concentração do produto químico de ensaio deve ser medida, no mínimo, nos tratamentos com maior e menor concentração, mas, de preferência, em todos os tratamentos, no início e no final do ensaio. Para os ensaios semiestáticos (de renovação), em que a concentração do produto químico de ensaio se deve manter no intervalo de $\pm 20\%$ dos valores nominais, recomenda-se que, no mínimo, a concentração de ensaio mais elevada e a menor sejam analisadas quando acabam de ser preparadas e imediatamente antes da renovação. Para os ensaios em que não é de prever que a concentração do produto químico em estudo se mantenha no intervalo de $\pm 20\%$ do valor nominal, é necessário analisar todas as concentrações de ensaio no momento em que as soluções acabam de ser preparadas e imediatamente antes da renovação. Em caso de volume insuficiente para análise, pode ser útil a fusão de soluções de ensaio ou a utilização de câmaras alternativas do mesmo material, com o mesmo rácio volume/superfície das placas de 24 poços. Recomenda-se vivamente que os resultados se baseiem nas concentrações medidas. Se as concentrações não se mantiverem no intervalo de 80-120 % da concentração nominal, as concentrações com efeitos devem ser expressas relativamente à média geométrica das concentrações medidas; para mais detalhes, ver o capítulo 5 do *Guidance Document* da OCDE *Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures* (28).

ENSAIO NO LIMITE

37. Pode efetuar-se, utilizando os procedimentos descritos no presente método de ensaio, um ensaio no limite com uma concentração de 100 mg/l do produto químico de ensaio, ou até ao respetivo limite de solubilidade no meio de ensaio (se este for inferior), a fim de demonstrar que a CL_{50} é superior àquela concentração. O ensaio no limite deverá utilizar 20 embriões no tratamento, no controlo positivo e — se necessário — no controlo do solvente, e 24 embriões no controlo negativo. Se a percentagem de letalidade na concentração testada for superior à mortalidade no controlo negativo (ou no controlo do solvente) em 10 %, deverá realizar-se um estudo completo. Devem registar-se quaisquer efeitos observados. Caso a mortalidade seja superior a 10 % no controlo negativo (ou no controlo do solvente), o ensaio não é válido e deve ser repetido.

RESULTADOS E RELATÓRIO**Tratamento dos resultados**

38. Neste ensaio, cada poço é considerado uma réplica independente para análise estatística. As percentagens de embriões em que, pelo menos, uma das observações apicais é positiva às 48 e/ou à 96 horas são posteriormente representadas num gráfico, em função das concentrações testadas. Para o cálculo do declive da curva, os valores de CL_{50} e os limites de confiança (95 %), devem ser aplicados métodos estatísticos adequados (38) e consultado o *Guidance Document* da OCDE intitulado *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data* (39).

Relatório do ensaio

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

Produto químico de ensaio:

Substância monocomponentes:

— aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas relevantes;

- dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc. (incluindo o teor de carbono orgânico, se for o caso).

Substância multicomponentes, UVCB e mistura:

- caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Organismos sujeitos a ensaio:

- nome científico, estirpe, fonte e método de recolha dos ovos fertilizados e posterior manuseamento.

Condições de realização dos ensaios:

- procedimento de ensaio utilizado (por exemplo, renovação semiestática);
- fotoperíodo;
- planeamento do ensaio (por exemplo, o número de câmaras de ensaio, tipos de controlos);
- características de qualidade da água na manutenção dos peixes (p. ex., pH, dureza, temperatura, condutividade e oxigénio dissolvido);
- concentração de oxigénio dissolvido, pH, dureza total, temperatura e condutividade da solução de ensaio no início e após 96 horas;
- método de preparação das soluções-padrão e soluções de ensaio, bem como a frequência de renovação;
- justificação da utilização e da escolha do solvente, se não for água;
- concentrações nominais testadas e resultado de todas as análises efetuadas para determinação da concentração do produto químico de ensaio nos recipientes de ensaio; a eficiência de recuperação do método e do limite de quantificação (LoQ) também deverão ser registados;
- elementos comprovativos de que os controlos satisfizeram os critérios de validade;
- taxa de fertilização dos ovos;
- taxa de incubação nos grupos de tratamento e de controlo.

Resultados:

- valor da mais elevada concentração que não provoca mortalidade durante o período do ensaio;
- valor da menor concentração que provoca 100 % de mortalidade durante o período do ensaio;
- mortalidade cumulativa para cada concentração nos períodos de observação recomendados;
- valores de CL₅₀ às 96 horas (e, facultativamente, às 48 horas) para a mortalidade com limites de confiança a 95 %, se possível;
- gráfico da curva concentração-mortalidade no final do ensaio;
- mortalidade nos controlos (controlos negativos, controlos internos da placa, bem como controlo positivo e qualquer controlo do solvente utilizado);
- dados sobre os resultados de cada uma das quatro observações apicais;
- incidência e descrição de anomalias morfológicas e fisiológicas, se for caso disso (ver exemplos apresentados no apêndice 5, figura 2);
- incidentes no decurso do ensaio que poderiam ter influenciado os resultados;

- análise estatística e tratamento de dados (análise da função probit, modelo de regressão logística e média geométrica para a CL_{50});
- declive e limites de confiança da regressão (transformado) da curva concentração-resposta.

Qualquer desvio do método de ensaio e explicações pertinentes.

Discussão e interpretação dos resultados.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OCDE (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.
- (2) OCDE (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.
- (3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. e Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.
- (4) ISO (2007) International Standard Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) Organização Internacional de Normalização.
- (5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) — a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.
- (6) Schulte, C. e Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test — preliminary results. ATLA 22, 12-19.
- (7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). Tese de doutoramento, Universidade Técnica de Dresden, Alemanha.
- (8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. e Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.
- (9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.
- (10) Kammann, U., Vobach, M. e Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.
- (11) Groth, G., Kronauer, K. e Freundt, K.J. (1994) Effects of N,N-dimethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. In Vitro 8: 401-406.
- (12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. e Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with N-methylamine, N,N-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, N-methylaniline, N,N-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.
- (13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.
- (14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. e Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.
- (15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. e Carr G. J.. (2013) — Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783.

- (16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*: 149 (2), 196-209
- (17) Capítulo C.4 do presente anexo: Biodegradabilidade rápida.
- (18) Capítulo C.29 do presente anexo: Biodegradabilidade rápida, CO₂ em recipientes fechados.
- (19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology* 281: 25-36.
- (20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Reprod. Toxicol.* 33: 133-141.
- (21) Incardona, J.P., Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 257: 242-249.
- (22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253: 244-252.
- (23) Capítulo C.48 do presente anexo: Ensaio a Curto Prazo da Reprodução em Peixes. Ver apêndice 4a.
- (24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. in vitro* 23: 1436-1442.
- (25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klammer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4097-4102.
- (26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1676-1682.
- (27) Norma internacional ISO (1996). Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Disponível em: [<http://www.iso.org>].
- (28) OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OCDE, Paris.
- (29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. *J. Fish Biol.* 10: 121-173.
- (30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5ª edição. Eugene, Imprensa da Universidade do Óregon, Instituto da Neurociência, EUA.
- (31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>
- (32) Comissão Europeia (2007) Recomendação da Comissão 2007/526/CE de 18 de Junho de 2007 relativa a diretrizes sobre o alojamento e os cuidados a prestar aos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos (notificada com o número C(2007) 2525) [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:PT:PDF>]
- (33) União Europeia (2010) 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. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 276:33-79; 20.10.2010

- (34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebraäbrbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.
 - (35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. e Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.
 - (36) Capítulo C.2 do presente anexo: *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test.
 - (37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978
 - (38) Norma internacional ISO (2006). Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Disponível em: [<http://www.iso.org>].
 - (39) OCDE (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OCDE, Paris.
 - (40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper «Fish embryo toxicity assays» UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.
-

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Parâmetro apical: Indicador de efeitos ao nível de toda a população.

Blástula: Formação celular em torno do polo animal que abrange uma parte determinada do saco vitelino.

Produto químico: Substância ou mistura.

Epíbole: Enorme proliferação de, predominantemente, células epidérmicas na fase de gastrulação do embrião e o seu movimento da zona dorsal para a zona ventral, através do qual, as camadas celulares endodérmicas são integradas num processo tipo de invaginação e o saco vitelino é incorporado no embrião.

Ensaio de fluxo contínuo: Um ensaio com fluxo contínuo de soluções de ensaio através do sistema de ensaio, durante o período de exposição.

Controlo Interno da Placa: Controlo interno com 4 poços cheios com água de diluição por placa de 24 poços, com vista a identificar potenciais contaminações das placas pelo fabricante ou pelo investigador durante o processo e qualquer efeito da placa que possa influenciar o resultado do ensaio (p. ex., gradiente de temperatura).

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada.

Água de manutenção: Água onde a criação dos peixes adultos é realizada.

Concentração Letal Média (CL 50): Concentração do produto químico em estudo que se estima ser letal para 50 % dos organismos de ensaio durante o ensaio.

Ensaio semiestático com renovação: Ensaio com renovação frequente das soluções de ensaio após períodos de tempo determinados (por exemplo, a cada 24 horas).

SMILES: *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*

Somito: No desenvolvimento do embrião vertebrado, os somitos são massas de mesoderme distribuídos lateralmente ao tubo neural, que acabará por desenvolver derme (dermatomo), músculo esquelético (miotomo) e vértebras (esclerótomo).

Ensaio estático: Ensaio em que as soluções de ensaio permanecem inalteradas durante o período do ensaio.

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

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

Apêndice 2

**MANUTENÇÃO, REPRODUÇÃO E CONDIÇÕES NORMAIS PARA OS ENSAIOS DE TOXICIDADE
AGUDA EM EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA**

Peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)		
Origem da espécie	Índia, Birmânia, Malaca, Samatra	
Dimorfismo sexual	Fêmeas: ventre proeminente, quando transportam ovos Machos: mais fino, e coloração alaranjada entre listras longitudinais azuis (especialmente patente na barbatana anal)	
Alimentação	Alimento seco em flocos (máx. 3 % do peso dos peixes por dia) 3-5 vezes por dia; além disso, náuplios de artémia (<i>Artemia</i> sp.) e/ou pequenos dafnídeos de dimensão adequada proveniente de uma fonte não contaminada. O alimento vivo constitui uma fonte de enriquecimento ambiental e, por conseguinte, deve ser dado, sempre que possível. Para garantir a máxima qualidade da água, alimento em excesso e os excrementos devem ser retirados cerca de uma hora após a alimentação.	
Peso aproximado do peixe adulto	Fêmeas: 0,65 ± 0,13 g Machos: 0,5 ± 0,1 g	
Manutenção dos peixes progenitores	Iluminação	Lâmpadas fluorescentes (espectro largo); 10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lux ou 50-100 ft-c (níveis ambientes no laboratório) 12-16 horas de fotoperíodo
	Temperatura da água	26 ± 1 °C
	Qualidade da água	O ₂ ≥ 80 % de saturação, dureza: por exemplo, ~ 30-300 mg/l CaCO ₃ , NO ₃ ⁻ : ≤ 48 mg/l, NH ₄ ⁺ e NO ₂ ⁻ : < 0,001 mg/l, cloro residual < 10 µg/l, cloro orgânico total < 25 ng/l, pH = 6,5 – 8,5
	Outros critérios de qualidade da água	Partículas em suspensão < 20 mg/l, carbono orgânico total < 2 mg/l, pesticidas organofosforados totais < 50 ng/l, soma dos pesticidas organoclorados totais e bifenilos policlorados < 50 ng/l
	Dimensão dos reservatórios para manutenção	por exemplo, 180 l, 1 peixe/l
	Purificação de água	Permanente (carvão vegetal filtrado); outras possibilidades incluem combinações com sistemas de manutenção de renovação semiestática ou com sistemas de fluxo contínuo com renovação contínua da água
	Recomendado o rácio de reprodutores macho/fêmea	2: 1 (ou desova massiva)
Tanques de desova	por exemplo, tanques de 4 l equipados com grelhas de aço no fundo e plantas artificiais como estimulantes de reprodução; mantas de aquecimento externo ou desova massiva nos tanques de manutenção	
Estrutura e aspeto do ovo	Córion estável (ou seja, altamente transparentes, não pegajoso, diâmetro ~ 0,8–1,5 mm)	
Taxa de desova	Uma única fêmea madura deposita, pelo menos, 50-80 ovos por dia. Em função da estirpe, as taxas de desova podem ser consideravelmente mais elevadas. A taxa de fertilização deve ser ≥ 70 %. Para os peixes a desovarem pela primeira vez, as taxas de fertilização dos ovos podem ser mais baixas nas primeiras desovas.	
Tipo de ensaio	Estático, de renovação semiestática, por fluxo contínuo, 26 ± 1 °C, câmaras de ensaio condicionadas 24 horas (por exemplo, placas de 24 poços 2,5-5 ml por cavidade)	

Apêndice 3

DESENVOLVIMENTO NORMAL DO PEIXE-ZEBRA A 26 °C

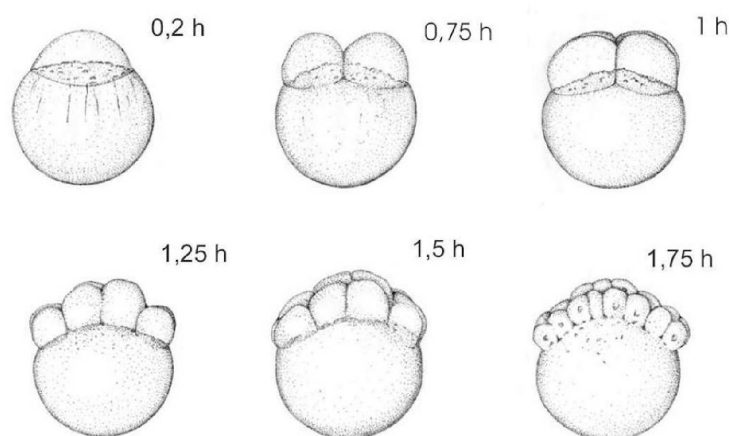


Figura 1: Fases iniciais de desenvolvimento de peixe-zebra (*Danio rerio*) selecionadas: 0,2-1,75 horas após fertilização (de Kimmel *et al.*, 1995 (35)). A sequência temporal do desenvolvimento normal, pode ser tida em consideração com vista a diagnosticar tanto a fertilização como a viabilidade de ovos (ver ponto 26: Seleção de ovos fertilizados).

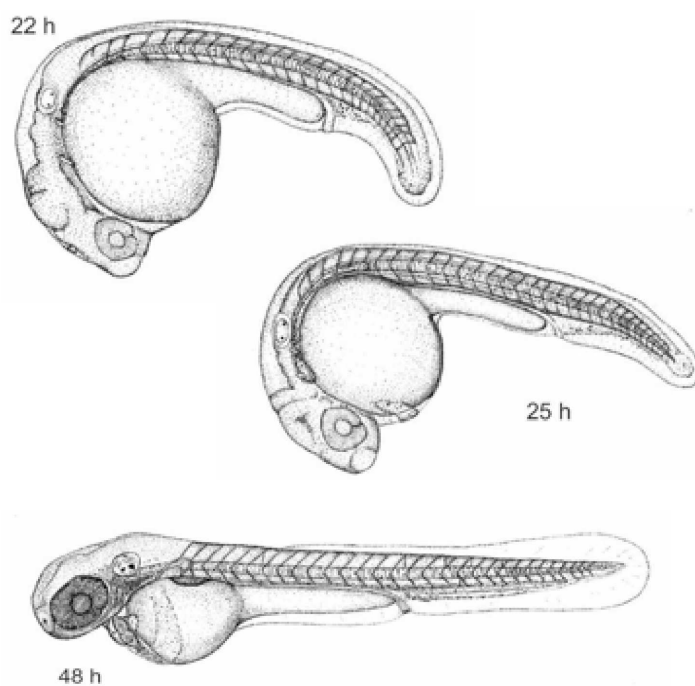


Figura 2: Fases finais de desenvolvimento de peixe-zebra (*Danio rerio*) selecionadas (embrião sem o córion para otimizar a visibilidade): 22-48 horas pós-fertilização (de Kimmel *et al.*, 1995 (35)).

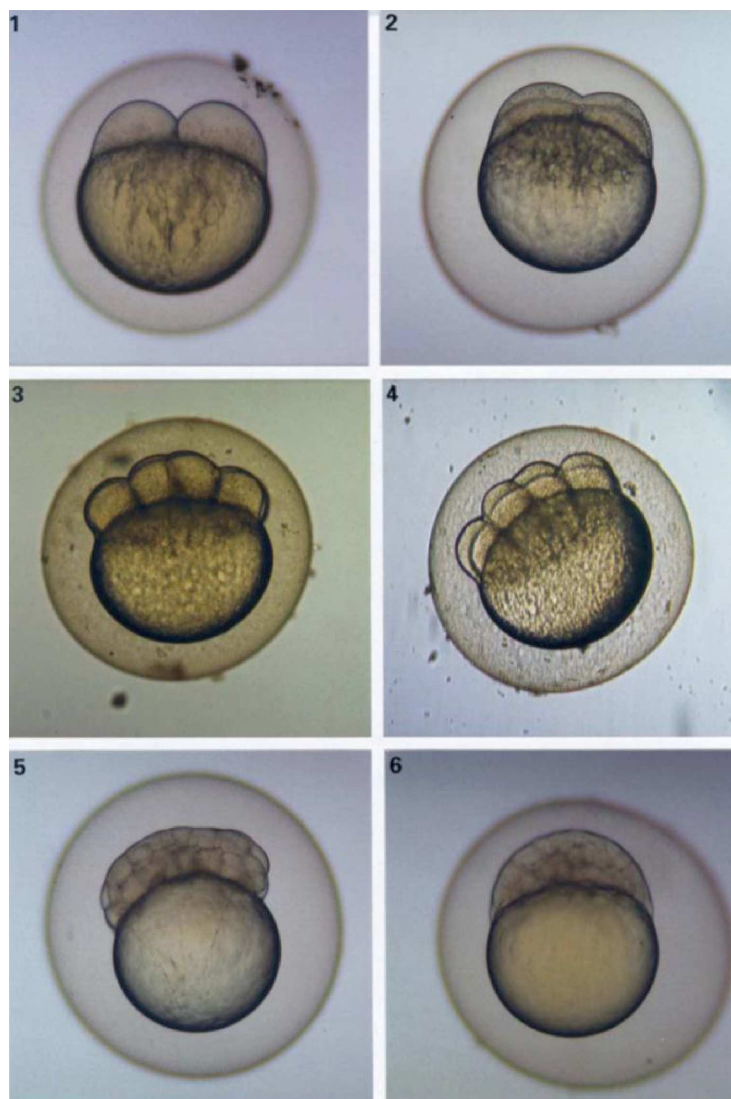
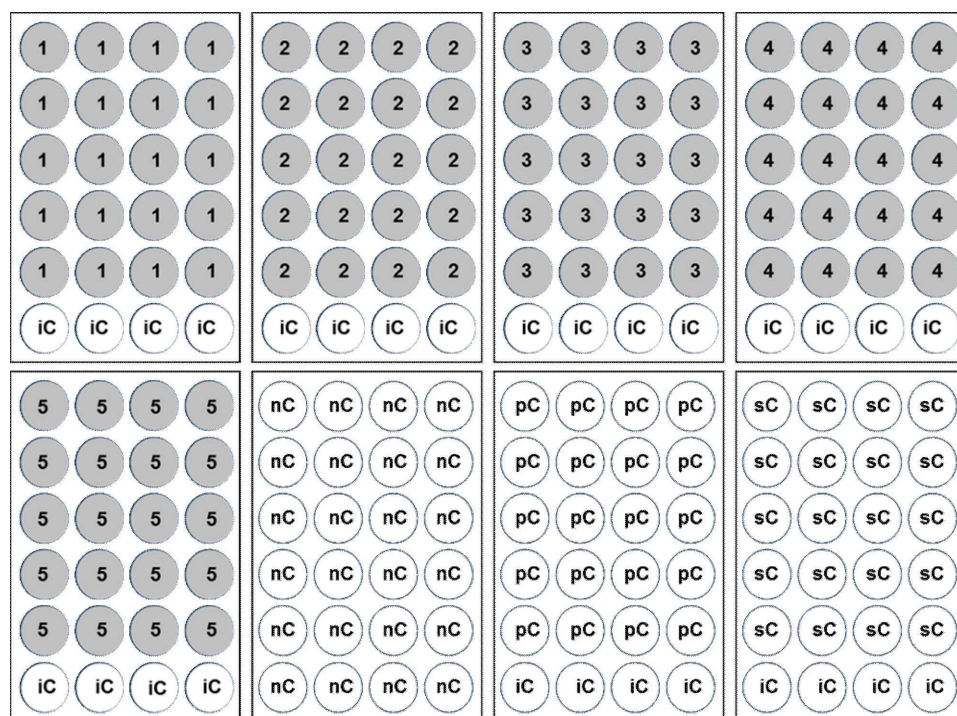


Figura 3: Desenvolvimento normal de embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*): (1) 0,75 horas, fase de 2 células; (2) 1 hora, fase de 4 células; (3) 1,2 horas, fase de 8 células; (4) 1,5 horas, fase de 16 células; (5) 4,7 horas, início da epíbole; (6) 5,3 horas, aproximadamente 50 % da epíbole (de Braunbeck & Lammer 2006 (40))

Apêndice 4

Figura 1

Disposição das placas de 24 poços



1-5 = cinco concentrações de ensaio / produto químico;

nC = controlo negativo (água de diluição);

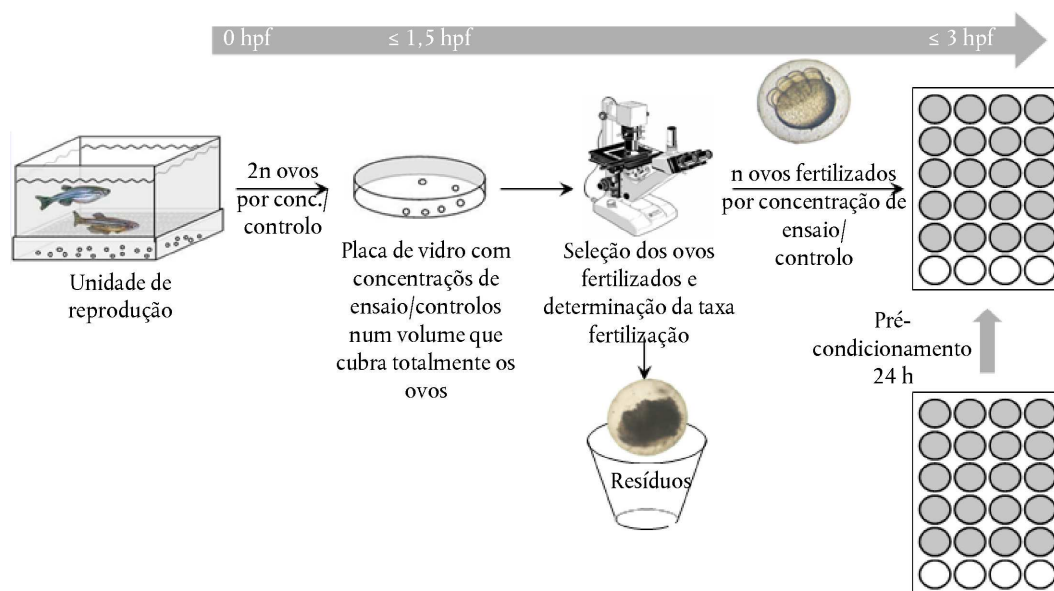
iC = controlo interno da placa (água de diluição);

pC = controlo positivo (3,4-DCA 4mg/l);

sC = controlo do solvente

Figura 2

Ilustração do ensaio de toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra (da esquerda para a direita): produção de ovos, recolha dos ovos, pré-exposição imediatamente após a fertilização em recipientes de vidro, seleção de ovos fertilizados com um microscópio invertido ou binocular e distribuição de ovos fertilizados em placas de 24 poços preparados com as respetivas concentrações/controles de ensaio, n = número de ovos necessários por concentração/controlo de ensaio (neste caso 20), hpf = horas pós-fertilização.

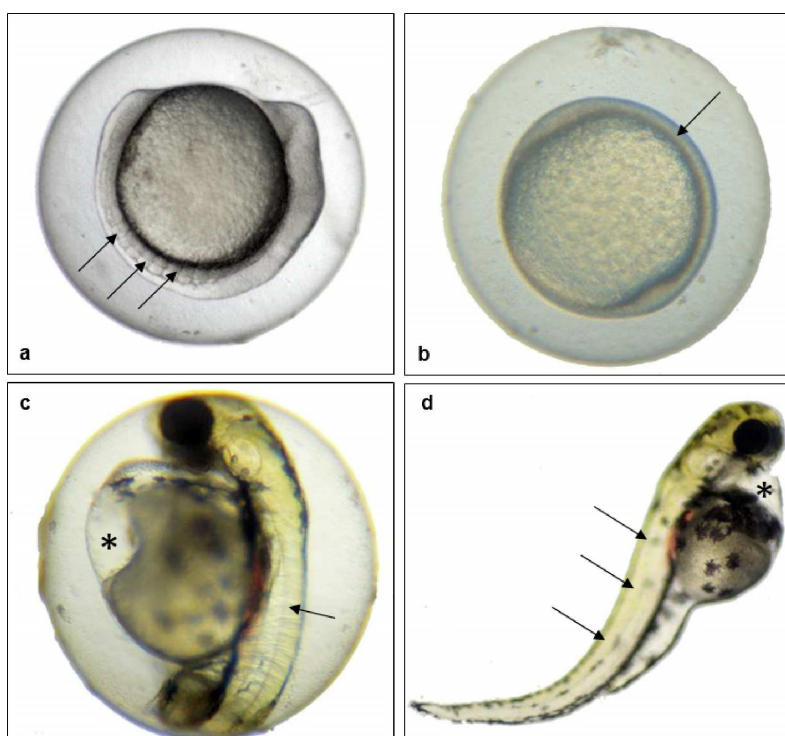


*Apêndice 5***ATLAS DOS PARÂMETROS LETAIS PARA O ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA**

Os seguintes parâmetros apicais indicam a toxicidade aguda e, consequentemente, a morte dos embriões: coagulação do embrião, não separação de cauda, falta de formação dos somitos e ausência de batimentos cardíacos. As seguintes micrografias foram selecionados para ilustrar estes parâmetros.

*Figura 1***Coagulação do embrião:**

Através de microscopia de campo claro, embriões de peixe-zebra coagulados mostram uma variedade de inclusões não transparentes.

*Figura 2***Falta de formação dos somitos:**

Embora o consequente atraso no desenvolvimento de aproximadamente 10 horas, o embrião de peixe-zebra com 24 horas de idade (a) mostra somitos bem desenvolvidos ($\rightarrow$), enquanto que o embrião (b) não revela qualquer sinal de formação de somitos ($\rightarrow$). Embora apresentando um edema pronunciado no saco vitelino (*), o embrião de peixe-zebra com 48 horas de idade (a) mostra somitos em fases de desenvolvimento distintos ($\rightarrow$), enquanto que o embrião de peixe-zebra com 96 horas de idade ilustrado em (d) não mostra qualquer sinal de formação de somitos. Note-se também a curvatura da coluna vertebral (escoliose) e o edema pericárdico (*) no embrião indicados em (d).

Figura 3

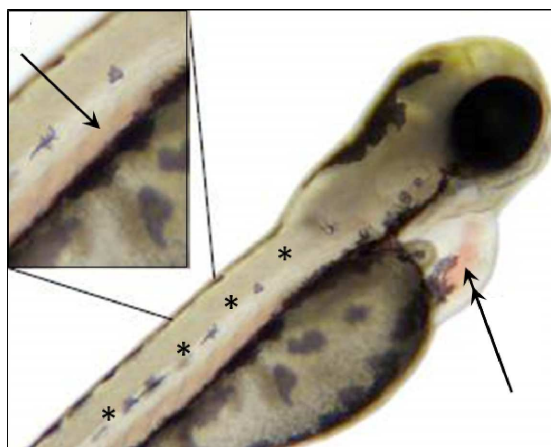
Não separação do broto da cauda em vista lateral



(a: $\rightarrow$; embrião de peixe-zebra com 96 horas de idade). Note-se também a falta do broto do olho (*).

Figura 4

A ausência de batimentos cardíacos



A ausência de batimentos cardíacos é, por definição, difícil de ilustrar numa micrografia. A ausência de batimentos cardíacos é indicada pela não convulsão do coração (seta dupla). A imobilidade das células sanguíneas, por exemplo na aorta abdominal ($\rightarrow$ na inserção) não é um indicador de ausência de batimentos cardíacos. Note-se também a falta de formação de somitos neste embrião (*, homogêneo e não por aparência segmentar dos tecidos musculares). O tempo de observação para registar a ausência de batimentos cardíacos deve ser pelo menos de um minuto, com uma ampliação mínima de 80 $\times$.

C.50 Ensaio de toxicidade em *Myriophyllum spicatum* sem sedimentos**INTRODUÇÃO**

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline 238* (2014) da OCDE. Foi concebido para avaliar a toxicidade de produtos químicos para a espécie *Myriophyllum spicatum*, uma dicotiledónea subaquática pertencente à família da pinheirinha-de-água. Baseia-se no atual método de ensaio ASTM (1), modificado como um sistema de ensaio isento de sedimentos (2), para estimar a ecotoxicidade intrínseca dos produtos químicos em estudo (independente da distribuição/do comportamento do produto químico em estudo entre a água e os sedimentos). Na fase aquosa, a complexidade analítica de um sistema de ensaio sem sedimentos é baixa (apenas na fase aquosa) e os resultados podem ser analisados em paralelo e/ou comparados com os resultados obtidos no ensaio com *Lemna sp.* (3); além disso, as condições de esterilidade necessárias permitem manter os efeitos dos microrganismos e das algas (absorção química/degradação, etc.) a um nível tão baixo quanto possível. Este ensaio não substitui outros ensaios de toxicidade em meio aquático; deverá, isso sim, complementá-los de modo a possibilitar uma avaliação mais completa dos riscos e dos perigos para a planta aquática. O método de ensaio foi validado por um estudo interlaboratorial (4).
2. Descrevem-se os pormenores do ensaio com renovação (semiestático) e sem renovação (estático) da solução de ensaio. Consoante os objetivos do ensaio e os requisitos regulamentares, recomenda-se a utilização do método semiestático, por exemplo, para as substâncias que desaparecem rapidamente da solução por efeito de volatilização, adsorção, fotodegradação, hidrólise, precipitação ou biodegradação. Para mais orientações, consultar a referência bibliográfica (5). Este método de ensaio aplica-se a substâncias em relação às quais o método tenha sido validado — para mais pormenores, ver o relatório do estudo interlaboratorial (4) — ou a formulações, ou misturas conhecidas; se uma mistura for objeto de ensaio, os seus constituintes devem ser, tanto quanto possível, identificados e quantificados. O método de ensaio de *Myriophyllum spicatum* sem sedimentos complementa o ensaio de toxicidade de *Myriophyllum spicatum* água-sedimento (6). Antes da aplicação do método para o ensaio de uma mistura com fins regulamentares, importa ponderar se, e em caso afirmativo, por que motivo, o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito regulamentar para o ensaio da mistura.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

3. Fazem-se culturas de plantas da espécie *Myriophyllum spicatum* em crescimento contínuo (apenas em meio de cultura de Andrews modificado, ver apêndice 2), com diferentes concentrações do produto químico em estudo, por um período de 14 dias, num sistema de ensaio sem sedimentos. O objetivo do ensaio consiste em quantificar os efeitos do produto químico em estudo sobre o crescimento vegetativo durante aquele período, com base na avaliação de determinadas variáveis de medição. O crescimento do comprimento dos rebentos, ramos laterais e raízes, bem como o desenvolvimento do peso fresco e do peso seco e o aumento de verticilos, são as variáveis de medição. Além disso, têm-se em conta alterações qualitativas distintivas nos organismos de ensaio, tais como a desfiguração ou clorose e necrose, indicadas por coloração amarelada ou branca e castanha. Para quantificar os efeitos relacionados com o produto químico em estudo, compara-se o crescimento nas soluções de ensaio com o dos controlos e determina-se a concentração que causa uma inibição de x % no crescimento, expressa como EC_x ; « x » pode ser qualquer valor dependente dos requisitos regulamentares — p. ex., EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} . De notar que as estimativas dos valores de EC_{10} e EC_{20} são apenas fiáveis e adequadas nos ensaios em que os coeficientes de variação nas plantas do controlo sejam inferiores ao nível de efeito estimado, ou seja, os coeficientes de variação devem ser < 20 % para a estimativa sólida de uma EC_{20} .
4. Deve determinar-se tanto a taxa média de crescimento específico (calculada com base em avaliações do comprimento do rebento principal e em três outras variáveis de medição) como o rendimento (calculado a partir do aumento do comprimento do rebento principal e de três outras variáveis de medição) das plantas tratadas e não tratadas. A taxa de crescimento específico (r) e o rendimento (y) são posteriormente utilizados para determinar a $E_r C_x$ (p. ex., $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) e a $E_y C_x$ (p. ex., $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$), respetivamente.
5. Por outro lado, a menor concentração com efeito observável (LOEC) e a concentração sem efeitos observáveis (NOEC) podem ser determinadas estatisticamente.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

6. Deve utilizar-se um método analítico com sensibilidade adequada para a quantificação do produto químico no meio de ensaio. As informações sobre o produto químico em estudo que poderão ser úteis para estabelecer as condições do ensaio são, entre outras, a fórmula estrutural, a pureza e as eventuais impurezas, a solubilidade em água, a estabilidade à luz e em água, a constante de dissociação (pK_a), o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), a pressão de vapor e a biodegradabilidade. A solubilidade em água e a pressão de vapor podem ser utilizadas para calcular a constante da Lei de Henry, que indicará a probabilidade da ocorrência de perdas significativas do produto químico em estudo durante o período de ensaio. Dessa forma, contribuirá para indicar se é necessário adotar medidas específicas para o controlo dessas perdas. Nos casos em que as informações sobre a solubilidade e a estabilidade do produto químico em estudo forem imprecisas, recomenda-se que estes parâmetros sejam avaliados nas condições do ensaio, ou seja, com os mesmos meio de cultura, temperatura e regime de iluminação que se utilizarão no ensaio.
7. O controlo do pH do meio é particularmente importante, por exemplo, no caso dos ensaios com metais ou substâncias hidroliticamente instáveis. Para mais pormenores sobre o ensaio de produtos químicos cujas propriedades físico-químicas dificultam o ensaio, consultar o documento de orientações da OCDE (5).

VALIDADE DO ENSAIO

8. Para que o ensaio seja válido, o tempo de duplicação do comprimento do rebento principal no grupo de controlo deve ser inferior a 14 dias. Utilizando os meios e as condições de ensaio descritos no presente método, este critério pode ser cumprido através de um regime de ensaio estático ou semiestático.
9. O coeficiente médio de variação do rendimento, com base em medições do peso fresco dos rebentos (ou seja, do início ao fim do ensaio) e em outras variáveis de medição (ver ponto 37), nas culturas de controlo, não deve exceder 35 % entre os replicados.
10. Mais de 50 % dos replicados do grupo de controlo são mantidos esterilizados durante o período de exposição de 14 dias, o que significa que, visivelmente, não estão contaminados por outros organismos, como algas, fungos e bactérias (solução límpida). *Nota:* As orientações sobre a forma de avaliar a esterilidade são apresentadas no relatório do estudo interlaboratorial (4).

PRODUTO QUÍMICO DE REFERÊNCIA

11. Para a verificação do procedimento de ensaio, podem ser ensaiados um ou mais produtos químicos de referência, como o 3,5-diclorofenol (3,5-DCP), que se utiliza no estudo interlaboratorial (4); a partir dos dados do estudo interlaboratorial, os valores médios de EC_{50} do 3,5-DCP para as diferentes variáveis de resposta (ver pontos 37-41 do presente método de ensaio) situam-se entre 3,2 mg/l e 6,9 mg/l (ver relatório do estudo interlaboratorial para informações sobre o intervalo de confiança destes valores). É aconselhável submeter a ensaio um produto químico de referência pelo menos duas vezes por ano ou, se os ensaios forem realizados com menor frequência, em paralelo com a determinação da toxicidade do produto químico em estudo.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Equipamento

12. Todos os equipamentos que entram em contacto com os meios de ensaio devem ser de vidro ou de outro material quimicamente inerte. O material de vidro utilizado para culturas e ensaios deve ser isento de quaisquer contaminantes químicos que possam passar para o meio de ensaio e deve ser esterilizado. Os recipientes de ensaio devem ser suficientemente grandes para que os rebentos nos recipientes de controlo possam crescer na fase aquosa sem atingir a superfície do meio de ensaio no final do mesmo. Recomendam-se tubos de ensaio de vidro de borossilicato de paredes espessas sem rebordo, diâmetro interior de aproximadamente 20 mm, comprimento de aproximadamente de 250 mm e com tampas de alumínio.
13. Uma vez que o meio de cultura de Andrews modificado contém sacarose (que estimula o crescimento de fungos e bactérias), as soluções de ensaio devem ser preparadas em condições estéreis. Todos os líquidos, bem como o equipamento, são esterilizados antes da utilização. A esterilização é efetuada por tratamento com ar aquecido (210 °C), durante 4 horas ou em autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Além disso, todos os frascos, pratos, vasos, etc., e outros equipamentos, são submetidos a tratamento à chama numa bancada de trabalho estéril, imediatamente antes da utilização.

14. As culturas e os recipientes de ensaio não devem ser conservados juntos. Para tal, o melhor será utilizar câmaras de crescimento, incubadoras ou mesmo salas separadas. A iluminação e a temperatura devem ser controláveis e mantidas a um nível constante.

Organismo de ensaio

15. O *Myriophyllum spicatum* — uma dicotiledónea subaquática — é uma espécie da família da pinheirinha-de-água. Entre junho e agosto, flores rosa-esbranquiçadas impercetíveis assomam acima da superfície da água. As plantas estão enraizadas no solo por um sistema sólido de rizomas e podem ser encontradas em águas eutróficas não poluídas e em águas minerais mais calcificadas com substrato enlameado, em todo o hemisfério norte. A espécie *Myriophyllum spicatum* prefere água doce, mas também é encontrada em águas salobras.
16. Para o ensaio de toxicidade sem sedimentos, são necessárias plantas estéreis. Se o laboratório não dispuser de culturas regulares de *Myriophyllum spicatum*, é possível obter material vegetal estéril de outro laboratório, ou extrair material vegetal não estéril do campo ou ainda obtê-lo através de um fornecedor comercial; se as plantas forem provenientes do campo, deve prever-se uma verificação taxonómica da espécie. Quando forem recolhidas no campo ou obtidas através de um fornecedor comercial, as plantas devem ser esterilizadas (1) e mantidas em cultura no mesmo meio que será utilizado para o ensaio durante, pelo menos, oito semanas antes do mesmo. Os locais de colheita no campo onde se faz a recolha de culturas de arranque devem estar isentos de fontes evidentes de poluição. É necessário tomar precauções especiais para garantir que é obtida a espécie correta na recolha de *Myriophyllum spicatum* no campo, especialmente nas regiões em que esta é capaz de se cruzar com outras espécies de *Myriophyllum*. Caso sejam obtidas de outro laboratório, as plantas devem ser mantidas da mesma forma durante, pelo menos, três semanas. Deve ser sempre indicada a origem do material vegetal e da espécie utilizada para o ensaio.
17. A qualidade e a uniformidade das plantas utilizadas para o ensaio terão influência significativa no resultado, pelo que as mesmas devem ser selecionadas cuidadosamente. Devem utilizar-se plantas jovens, de crescimento rápido e sem lesões ou descoloração (clorose) visíveis. O apêndice 4 apresenta mais informações sobre a preparação do organismo de ensaio.

Cultura

18. Para reduzir a frequência da manutenção das culturas — por exemplo, durante os períodos em que não se prevejam ensaios com *Myriophyllum* —, estas podem ser conservadas em ambiente escuro e a baixa temperatura ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \pm 2^\circ\text{C}$). O apêndice 3 apresenta mais informações sobre as técnicas de cultura.
19. Pelo menos 14 a 21 dias antes do ensaio, um número suficiente de organismos de ensaio será transferido, em condições assépticas, para meio fresco esterilizado e cultivado durante 14 a 21 dias nas condições de ensaio, como pré-cultura. O apêndice 4 apresenta mais informações sobre as técnicas de pré-cultura.

Meio de ensaio

20. Apenas um meio nutriente é recomendado para *Myriophyllum spicatum* num sistema de ensaio sem sedimentos, conforme descrito no apêndice 2. Recomenda-se uma modificação do meio de cultura de Andrews para as culturas e os ensaios com *Myriophyllum spicatum*, como se descreve em (1). A partir de cinco soluções de reserva de nutrientes, elaboradas separadamente com adição de sacarose a 3 %, prepara-se o meio de cultura de Andrews modificado. O apêndice 2 apresenta mais informações sobre a preparação do meio.
21. Para a obtenção de soluções de ensaio (por diluição conforme adequado), é necessário o meio de cultura de Andrews modificado e dez vezes concentrado. A composição deste meio é dada no apêndice 2.

Soluções de ensaio

22. As soluções de ensaio são geralmente preparadas por diluição de soluções de reserva. As soluções de reserva do produto químico em estudo são normalmente preparadas por dissolução do produto químico em água desmineralizada (destilada ou desionizada). A adição dos nutrientes é realizada utilizando o meio de cultura de Andrews modificado e dez vezes concentrado.

23. As soluções de reserva do produto químico em estudo podem ser esterilizadas em autoclave a 121 °C durante 20 minutos ou por filtração através de membrana, desde que a técnica de esterilização utilizada não desnature o produto químico em estudo. As soluções de ensaio podem também ser preparadas em água desmineralizada ou meio, em condições estéreis. A termoestabilidade e a adsorção sobre diferentes superfícies devem ser ponderadas na seleção do processo de esterilização das soluções de reserva do produto químico em estudo. Por isso, recomenda-se que as soluções de reserva sejam preparadas em condições estéreis, ou seja, utilizando material estéril para a dissolução do produto químico em estudo em água esterilizada e em condições de esterilidade (por exemplo, esterilização à chama, dispositivos de fluxo laminar, etc.). Esta técnica de preparação de soluções de reserva esterilizadas é válida tanto para as substâncias como para as misturas.
24. A concentração mais elevada do produto químico em estudo no ensaio não deve, normalmente, ser superior ao limite de solubilidade em água do produto nas condições de ensaio. No caso de produtos químicos com baixa solubilidade em água, poderá ser necessário preparar uma solução de reserva concentrada ou dispersar o produto por meio de um dispersante ou solvente orgânico, de modo a facilitar a adição de quantidades exatas do produto químico ao meio de ensaio e as suas dispersão e dissolução. Devem ser desenvolvidos todos os esforços para evitar utilizar materiais desse tipo. A utilização de dispersantes ou de solventes auxiliares não deverá acarretar qualquer fitotoxicidade. A acetona e a dimetilformamida, por exemplo, incluem-se entre os solventes mais comuns que não causam fitotoxicidade em concentrações até 100 µl/l. Caso se utilize um dispersante ou um solvente, deve especificar-se a sua concentração final, tão baixa quanto possível (≤ 100 µl/l), e todos os recipientes de exposição e de controlo devem ser expostos à mesma concentração de dispersante ou solvente. Para mais orientações sobre a utilização de dispersantes, consultar a referência bibliográfica (5).

Grupos de ensaio e de controlo

25. O conhecimento prévio da toxicidade do produto químico em estudo para a *Myriophyllum spicatum* — determinada com base nos resultados de ensaios de determinação da gama de concentrações — permite uma mais fácil escolha das concentrações a utilizar no ensaio. No ensaio de toxicidade definitivo, devem, geralmente, estudar-se cinco (tal como no ensaio de inibição de crescimento com *Lemna*, capítulo C.26 do presente anexo) a sete concentrações de ensaio, em progressão geométrica; devem ser escolhidas de modo a que os valores da NOEC e da EC₅₀ sejam abrangidos pela gama de concentrações (ver abaixo). De preferência, o fator de separação entre as concentrações de ensaio não deve ser superior a 3,2; no entanto, poderá ser utilizado um valor mais elevado quando a curva de concentração-resposta for pouco pronunciada. Deve apresentar-se uma justificação caso se utilizem menos de cinco concentrações. Devem ser utilizados pelo menos cinco replicados de cada concentração de ensaio.
26. Para efeitos da definição da gama de concentrações (tanto nos ensaios de determinação da gama quanto nos ensaios de toxicidade definitivos) devem tomar-se em conta os seguintes elementos:

Para a determinação de uma EC_x, as concentrações de ensaio devem abranger o valor da EC_x, de modo a garantir um nível de confiança apropriado. Por exemplo, para a determinação da EC₅₀, a concentração de ensaio mais elevada deve ser superior ao valor de EC₅₀. Se o valor de EC₅₀ se situar fora da gama de concentrações ensaiadas, os intervalos de confiança associados serão maiores, o que poderá impossibilitar o ajustamento de um modelo estatístico.

Se o objetivo for a determinação da LOEC/NOEC, a concentração mais baixa ensaiada deve ser suficientemente baixa para que o crescimento não seja significativamente inferior ao dos controlos. Por outro lado, a concentração mais elevada a ensaiar deve ser suficientemente alta para que o crescimento seja significativamente inferior ao do controlo. De outro modo, o ensaio terá de ser repetido com uma gama de concentrações diferente (exceto se a concentração máxima já se encontrar perto do limite de solubilidade ou da concentração máxima pretendida, por exemplo, 100 mg/l).

27. Todos os ensaios devem incluir controlos constituídos pelo mesmo meio nutriente e organismo de ensaio (a escolha do material vegetal deve ser tão homogênea quanto possível, novos ramos laterais de pré-culturas, reduzidos a 2,5 cm desde a base), que estejam sujeitos às mesmas condições ambientais e procedimentos que os recipientes de ensaio, mas sem adição do produto químico em estudo. Caso se utilize um dispersante ou solvente auxiliar, o ensaio deve incluir um controlo suplementar, com a mesma concentração de solvente/dispersante que os recipientes com o produto químico em estudo. O número de replicados dos recipientes de controlo (e de recipientes com solvente, se aplicável) deve ser pelo menos dez.

28. Caso não seja necessário determinar a NOEC, o ensaio poderá ser alterado de modo a aumentar o número de concentrações estudadas, reduzindo o número de replicados por concentração. Em todo o caso, o número de replicados dos controlos deve, no entanto, ser de, pelo menos, dez.

Exposição

29. Novos ramos laterais da pré-cultura reduzidos a 2,5 cm desde a base são distribuídos aleatoriamente pelos recipientes de ensaio, em condições assépticas; cada recipiente de ensaio contém um ramo lateral de 2,5 cm que deve ter um meristema apical numa ponta. O material vegetal escolhido deve ser da mesma qualidade em cada um dos recipientes de ensaio.
30. A colocação aleatória dos frascos de ensaio na incubadora é necessária para reduzir ao mínimo a influência das diferenças espaciais em termos de intensidade da luz ou de temperatura. É igualmente necessário mudar a posição dos frascos, por blocos ou de forma aleatória, após as amostragens ou mais frequentemente.
31. Se um ensaio preliminar de estabilidade mostrar que, no período de ensaio (14 dias), a concentração do produto químico em estudo não pode ser mantida (ou seja, se a concentração medida diminuir mais de 80 % em relação à concentração inicial medida), recomenda-se a utilização de um regime de ensaio semiestático. Nesse caso, as plantas devem ser expostas a soluções de ensaio e de controlo preparadas no momento em, pelo menos, uma ocasião durante o ensaio (por exemplo, no dia 7). A frequência da exposição ao meio fresco dependerá da estabilidade do produto químico em estudo; poderá ser necessária uma frequência maior para manter quase constantes as concentrações de substâncias altamente instáveis ou voláteis.
32. A possibilidade de exposição através de aplicação foliar (aspersão) não está prevista no presente método de ensaio.

Condições de ensaio

33. Deve ser utilizada iluminação fluorescente com luz branca quente e/ou fria, para proporcionar uma radiação luminosa na gama de aproximadamente $100\text{--}150\ \mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, medida num comprimento de onda de fotossíntese (400–700 nm) em pontos que se encontrem à mesma distância da fonte luminosa que o fundo dos recipientes de ensaio (intensidade equivalente de 6 000 a 9 000 lux), recorrendo a um ciclo de 16 horas de luz seguidos de 8 horas de escuridão. O método de deteção e medição da luz e, em particular, o tipo de sensor utilizado, afetarão o valor medido. Os sensores esféricos (que reagem à luz proveniente de todos os ângulos acima e abaixo do plano de medição) e os sensores «de cosseno» (que respondem à luz proveniente de todos os ângulos acima do plano de medição) são preferíveis aos sensores unidirecionais e fornecem leituras mais elevadas para as fontes múltiplas de luz do tipo aqui descrito.
34. A temperatura dos recipientes de ensaio deve ser mantida a $23 \pm 2\ ^\circ\text{C}$. Contudo, em certos casos, como, por exemplo, nos ensaios de produtos químicos instáveis ou de metais, poderá ser necessário adotar cuidados adicionais em relação à variação de pH; o pH deve permanecer no intervalo de 6–9. Para mais informações, consultar a referência bibliográfica (5).

Duração

35. O ensaio terminará 14 dias depois de as plantas terem sido transferidas para os recipientes de ensaio.

Medições e determinações analíticas

36. No início do ensaio, o comprimento do rebento principal do organismo de ensaio é de 2,5 cm (ver ponto 29); este é medido com uma régua (ver apêndice 4), ou pela análise de imagens e fotografias. O comprimento do rebento principal do organismo de ensaio que apresenta um aspeto normal e anormal deve ser determinado no início do ensaio, pelo menos uma vez durante o período de exposição de 14 dias e no final do ensaio. Nota: Como alternativa para os laboratórios que não dispõem de análise de imagens, se a bancada de trabalho estiver esterilizada antes da adição de plantas nos recipientes de ensaio, pode também utilizar-se uma régua estéril para medir o comprimento dos rebentos principais no início e durante o ensaio. Qualquer alteração observada no desenvolvimento das plantas, por exemplo, no que respeita à deformação e ao aspeto dos rebentos, a indicações de necrose, clorose, à desagregação ou perda de flutuabilidade ou à dimensão e aspeto das raízes, deverá ser registada. As características mais significativas do meio de ensaio (por exemplo, presença de materiais em suspensão, crescimento de algas, fungos e bactérias nos recipientes de ensaio) devem também ser registadas.

37. Para além da determinação do comprimento do rebento principal durante o ensaio, devem também ser avaliados os efeitos do produto químico em estudo sobre três — ou mais — das seguintes variáveis de medição:
- Comprimento total dos ramos laterais
 - Comprimento total do rebento
 - Comprimento total da raiz
 - Peso fresco
 - Peso seco
 - Número de verticilos
- Nota 1:* As observações feitas durante o ensaio de determinação da gama de concentrações poderiam ajudar na seleção das medições adicionais relevantes entre as seis variáveis acima enumeradas.
- Nota 2:* A determinação dos pesos seco e fresco (parâmetros iv e v) é altamente desejável.
- Nota 3:* Dado que a sacarose e a luz (ou seja, a exposição das raízes à luz durante o ensaio) podem influenciar os transportadores de auxinas (hormonas de crescimento vegetal) e que alguns produtos químicos podem ter um modo de ação do tipo da auxina, a inclusão de pontos finais relativos à raiz (parâmetro iii) é questionável.
- Nota 4:* Os resultados do estudo interlaboratorial mostram um elevado coeficiente de variação ($> 60\%$) para o comprimento total do ramo lateral (parâmetro i). De qualquer forma, o comprimento total do ramo lateral é incluído no comprimento total do rebento (parâmetro ii) que mostre coeficientes de variação de $< 30\%$ mais aceitáveis.
- Nota 5:* Atendendo às considerações precedentes, os principais pontos finais recomendados são os seguintes: comprimento total dos rebentos, peso fresco e peso seco (parâmetros ii, iv e v); o parâmetro vi — número de verticilos — é deixado ao critério do experimentador.
38. O comprimento do rebento principal e o número de verticilos dispõem de uma vantagem, na medida em que podem ser determinados para cada recipiente de ensaio e de controlo, no início, durante e no final do ensaio, por análise de imagens e fotografias, embora possa também utilizar-se uma régua estéril.
39. O comprimento total dos ramos laterais, o comprimento total da raiz (soma de todos os ramos laterais ou raízes) e o comprimento total dos rebentos (soma do comprimento do rebento principal e do comprimento total dos ramos laterais) podem ser medidos com uma régua no final do período de exposição.
40. O peso fresco e/ou seco deverá ser determinado no início do ensaio a partir de uma amostra da pré-cultura, representativa do que é utilizado para iniciar o ensaio, e no final do mesmo, com o material retirado das plantas de cada recipiente de ensaio e de controlo.
41. O comprimento total dos ramos laterais, o comprimento total dos rebentos, o comprimento total da raiz, o peso fresco, o peso seco e o número de verticilos podem ser determinados do seguinte modo:
- Comprimento total dos ramos laterais: o comprimento total dos ramos laterais pode ser determinado pela medição de todos esses ramos com uma régua, no final do período de exposição. É a soma de todos os ramos laterais de cada recipiente de ensaio e de controlo.
 - Comprimento total do rebento: o comprimento do rebento principal pode ser determinado por análise visual ou utilizando uma régua. É a soma do comprimento total dos ramos laterais e do comprimento do rebento principal de cada recipiente de ensaio e de controlo, no final do período de exposição.

- iii. Comprimento total da raiz: o comprimento da raiz pode ser determinado pela medição de todas as raízes com uma régua no final do período de exposição. É a soma de todas as raízes de cada recipiente de ensaio e de controlo.
- iv. Peso fresco: o peso fresco pode ser determinado por pesagem dos organismos de ensaio no final do período exposição. Qualquer material vegetal proveniente de cada recipiente de ensaio e de controlo deverá ser enxaguado com água destilada e secado com papel de celulose. Após esta preparação, o peso fresco é determinado por pesagem. A biomassa de partida (peso fresco) é determinada com base numa amostra dos organismos de ensaio extraída do mesmo lote utilizado para inocular os recipientes de ensaio.
- v. Peso seco: após a preparação para a determinação do peso fresco, os organismos de ensaio são secados a 60 °C até se obter um peso constante. Esta massa é o peso seco. A biomassa de partida (peso seco) é determinada com base numa amostra dos organismos de ensaio extraída do mesmo lote utilizado para inocular os recipientes de ensaio.
- vi. Número de verticilos: todos os verticilos serão contabilizados ao longo do rebento principal.

Frequência das medições e determinações analíticas

- 42. Caso se utilize um método de ensaio estático, deve medir-se o pH de cada tratamento no início e no final do ensaio. No caso dos ensaios semiestáticos, deve medir-se o pH da solução de ensaio «fresca» antes da sua utilização, bem como o pH das correspondentes soluções «usadas»
- 43. A intensidade luminosa deve ser medida, na câmara de crescimento, incubadora ou sala, em pontos que estejam à mesma distância da fonte de luz que os organismos de ensaio. A medição deverá ser efetuada pelo menos uma vez durante o ensaio. Deve ser registada diariamente a temperatura do meio contido num recipiente especialmente destinado para esse efeito e mantido nas mesmas condições na câmara de crescimento, incubadora ou sala utilizada para o ensaio (ou continuamente com um registador de dados).
- 44. Durante o ensaio, as concentrações do(s) produto(s) químico(s) em estudo devem ser determinadas a intervalos adequados. Nos ensaios estáticos, a exigência mínima é que as concentrações sejam determinadas no início e no final do ensaio.
- 45. Nos ensaios semiestáticos em que não seja de esperar que as concentrações do(s) produto(s) químico(s) em estudo se mantenham no intervalo de $\pm 20\%$ da concentração nominal, é necessário analisar todas as soluções de ensaio no momento em que forem preparadas e também imediatamente antes da respetiva utilização. No entanto, para os ensaios em que as concentrações iniciais medidas do(s) produto(s) químico(s) em estudo não se encontrem no intervalo de $\pm 20\%$ do valor nominal, mas em que se possam fornecer provas suficientes de que as concentrações iniciais são reprodutíveis e estáveis (isto é, se mantêm dentro da gama 80-120 % da concentração inicial), as determinações químicas podem ser limitadas às concentrações maior e menor usadas no ensaio. Em qualquer dos casos, só é necessária a determinação das concentrações de ensaio antes da sua utilização num dos recipientes replicados para cada concentração de ensaio (ou no conteúdo agrupado de todos os recipientes replicados).
- 46. Se existirem provas de que a concentração de ensaio não variou mais de $\pm 20\%$ relativamente ao valor da concentração nominal ou da concentração inicial medida, a análise dos resultados pode basear-se nos valores nominais ou iniciais medidos. Se a variação relativamente à concentração nominal ou à concentração inicial medida for superior a $\pm 20\%$, a análise dos resultados deve basear-se na média geométrica da concentração durante a exposição ou em modelos que descrevam a diminuição da concentração do produto químico em estudo (5).

Ensaio no limite

- 47. Em determinadas circunstâncias — por exemplo, se um ensaio preliminar indicar que o produto químico em estudo não apresenta efeitos tóxicos em concentrações até 100 mg/l ou até ao seu limite de solubilidade no meio de ensaio, ou no caso de uma fórmula até ao seu limite de capacidade de dispersão —, pode proceder-se a um ensaio no limite, com comparação das respostas de um grupo de controlo e de um grupo exposto ao produto químico em estudo a uma concentração de 100 mg/l ou que corresponda ao limite de solubilidade. Recomenda-se fortemente que isso seja confirmado por análise da concentração de exposição. Todas as condições de ensaio e critérios de validade anteriormente descritos são aplicáveis aos ensaios no limite, com exceção da necessidade de utilizar o dobro do número de replicados dos recipientes expostos. O crescimento dos grupos de controlo e de exposição pode ser analisado através de um ensaio estatístico de comparação das médias, como, por exemplo, o teste t de Student.

DADOS E RELATÓRIOS

Variáveis de resposta

48. O objetivo do ensaio consiste em determinar os efeitos de um produto químico sobre o crescimento vegetativo de *Myriophyllum spicatum*. O presente método de ensaio descreve duas variáveis de resposta.
- a) Taxa média de crescimento específico: esta variável de resposta é calculada com base no aumento logarítmico do comprimento do rebento principal e, adicionalmente, na evolução logarítmica de outros parâmetros de medição — isto é, comprimento total dos rebentos, peso fresco, peso seco ou número de verticilos em função do tempo (por dia) —, tanto nos recipientes de controlo como nos grupos expostos. Nota: No que se refere ao parâmetro de medição relativo ao comprimento total dos ramos laterais e ao comprimento total das raízes não é possível fazer um cálculo da taxa média de crescimento específico. No início do ensaio, o organismo (com base na preparação da pré-cultura) não tem ramos laterais nem raízes; a partir do valor zero, o cálculo da taxa média de crescimento específico não é definido.
- b) Rendimento: esta variável de resposta é calculada com base no aumento do comprimento do rebento principal e, adicionalmente, na evolução de outros parâmetros de medição — de preferência, o comprimento total dos rebentos, o peso fresco, o peso seco ou o número de verticilos e outros parâmetros, caso se considere útil — tanto nos recipientes de controlo como nos grupos expostos até ao final do ensaio.
49. As estimativas da toxicidade devem basear-se no comprimento do rebento principal e em três outras variáveis de medição (de preferência, o comprimento total do rebento, o peso fresco, o peso seco ou o número de verticilos — ver ponto 37 e notas 2, 4 e 5 do presente ponto), já que certos produtos químicos podem afetar outras variáveis de medição de forma muito mais marcada do que o comprimento do rebento principal. Esse efeito passará despercebido se o cálculo se basear exclusivamente no comprimento do rebento principal.

Taxa média de crescimento específico

50. A taxa média de crescimento específico durante um determinado período é calculada como o aumento logarítmico das variáveis de crescimento — comprimento do rebento principal e outras três variáveis de medição (comprimento total do rebento, peso fresco, peso seco ou número de verticilos) — aplicando a fórmula que a seguir se apresenta aos valores obtidos para cada replicado dos controlos e dos recipientes expostos ao produto químico em estudo:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

em que:

μ_{i-j} : taxa média de crescimento específico entre o momento i e o momento j

N_i : variável de medição no recipiente de ensaio ou de controlo no momento i

N_j : variável de medição no recipiente de ensaio ou de controlo no momento j

t: período decorrido entre i e j

Para cada um dos grupos de exposição e de controlo, calcular um valor médio da taxa de crescimento, associado às respetivas estimativas da variância.

51. Calcula-se a taxa média de crescimento específico para a totalidade do período de ensaio (na fórmula acima, «i» é o momento inicial e «j» o momento final do ensaio). Para cada uma das concentrações de ensaio e de controlo, calcular o valor médio da taxa média de crescimento específico, associado às respetivas estimativas da variância. Deve também avaliar-se a taxa de crescimento em cada secção do ensaio, para verificar os efeitos do produto químico durante o período de exposição (por exemplo, pela análise das curvas de crescimento após transformação logarítmica).

52. Pode então calcular-se a percentagem de inibição da taxa de crescimento (I_r) para cada concentração de ensaio (grupo exposto), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

em que:

% Ir: inibição percentual da taxa média de crescimento específico

μ_c : valor médio de μ no controlo

μ_T : valor médio de μ no grupo de tratamento

Rendimento

53. Os efeitos sobre o rendimento são determinados com base na variável de medição relativa ao comprimento do rebento principal e em três outras variáveis de medição (de preferência, o comprimento total do rebento, o peso fresco, o peso seco ou o número de verticilos) para cada recipiente de ensaio, no início e no final do ensaio. No que se refere ao peso fresco ou o peso seco, a biomassa de partida é determinada com base numa amostra dos organismos de ensaio extraída do mesmo lote utilizado para inocular os recipientes de ensaio. Para cada uma das concentrações de ensaio e para os controlos, calcular um valor médio de rendimento, associado às respetivas estimativas da variância. Para cada grupo exposto, a percentagem média de inibição do rendimento ($\%I_y$) pode ser calculada do seguinte modo:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

em que:

% Iy: redução percentual do rendimento

bC: biomassa final menos biomassa inicial do grupo de controlo

bT: biomassa final menos biomassa inicial do grupo exposto

Tempo de duplicação

54. Para determinar o tempo de duplicação (T_d) do comprimento do rebento principal e verificar o cumprimento do critério de validade correspondente (ponto 8), aplica-se a seguinte fórmula aos dados obtidos a partir dos recipientes de controlo:

$$T_d = \ln 2 / \mu$$

Onde μ é a taxa média de crescimento específico, determinada de acordo com os pontos 50-52.

Representação gráfica das curvas concentração-resposta

55. Devem representar-se as curvas de concentração-resposta, que relacionam a percentagem média de inibição da variável de resposta (I_r ou I_y , calculadas como se indica no ponto 53) com o logaritmo da concentração do produto químico em estudo.

Estimativa da EC_x

56. As estimativas da EC_x devem basear-se tanto na taxa média de crescimento específico (E_rC_x) como no rendimento (E_yC_x), devendo cada uma destas medidas, por seu turno, basear-se no comprimento do rebento principal e, eventualmente, em outras variáveis de medição (de preferência, comprimento total do rebento, peso fresco, peso seco ou número de verticilos). Tal deve-se ao facto de certos produtos químicos afetarem de forma diferente o comprimento do rebento principal e outras variáveis de medição. Os parâmetros de toxicidade pretendidos são, portanto, quatro valores de EC_x para cada um dos níveis de inibição x calculados: E_rC_x (comprimento do rebento principal); E_rC_x (de preferência, comprimento total do rebento, peso fresco, peso seco ou número de verticilos); E_yC_x (comprimento do rebento principal); e E_yC_x (de preferência, comprimento total do rebento, peso fresco, peso seco ou número de verticilos).

57. Cabe aqui notar que os valores de EC_x calculados através destas duas variáveis de resposta não são comparáveis e que a diferença entre esses valores é reconhecida para efeitos da utilização dos resultados do ensaio. Os valores de EC_x baseados na taxa média de crescimento específico ($E_r C_x$) são, na maioria dos casos, mais elevados do que os resultados baseados no rendimento ($E_y C_x$) — se forem seguidas as condições de ensaio apresentadas no presente método de ensaio —, devido à base matemática das respetivas abordagens. Esta diferença não deve ser interpretada como uma diferença de sensibilidade entre as duas variáveis de resposta, mas simplesmente como uma diferença matemática entre os valores.

Procedimentos estatísticos

58. O objetivo consiste em descrever a relação concentração-resposta de forma quantitativa, por análise de regressão. Pode utilizar-se uma regressão linear ponderada, antecedida de uma transformação de linearização dos dados de resposta, por exemplo, com modelos probit, logit ou de Weibull (7), mas a técnica preferida é a aplicação de procedimentos de regressão não linear, que permitem lidar melhor com as inevitáveis irregularidades dos dados e com os desvios em relação a uma boa distribuição. Nas zonas próximas da inibição nula ou total, essas irregularidades podem mesmo ser aumentadas pela transformação, o que irá interferir com a análise (7). Cabe aqui notar que os métodos-padrão de análise que utilizam os transformados probit, logit ou de Weibull se destinam à análise de dados quantais (por exemplo, mortalidade ou sobrevivência), pelo que terão de ser alterados para lidar com os dados relativos à taxa de crescimento ou ao rendimento. Alguns métodos para a determinação dos valores de EC_x a partir de dados contínuos podem ser consultados em (8), (9) e (10).
59. Para cada uma das variáveis de resposta em análise, utilizar a relação concentração-resposta para estimar os valores pontuais de EC_x . Sempre que possível, devem determinar-se os intervalos de confiança a 95 % para cada estimativa. A adequação do ajustamento da curva estimada pelo modelo de regressão aos dados de resposta deve ser avaliada, graficamente ou por métodos estatísticos. A análise por regressão deve utilizar os valores de cada replicado e não o valor médio para cada grupo exposto.
60. As estimativas da EC_{50} e os respetivos intervalos de confiança podem também ser obtidos utilizando uma interpolação linear com *bootstrapping* (10), quando os modelos/métodos de regressão disponíveis não forem aplicáveis aos dados existentes.
61. Para a estimativa da LOEC e, portanto, da NOEC, será necessário comparar as médias dos recipientes expostos, utilizando técnicas de análise da variância (ANOVA). A média para cada concentração é então comparada com a média observada nos controlos, utilizando um método apropriado de comparação múltipla ou de análise das tendências. Os testes de Dunnett ou de Williams (12)(13)(14)(15)(16) poderão ser úteis para esse efeito. É necessário verificar se é cumprido o pressuposto de homogeneidade da variância das análises ANOVA. Essa verificação poderá ser realizada graficamente ou através de um teste formal (15). Os testes de Levene ou de Bartlett são adequados neste contexto. O problema colocado pelo incumprimento do pressuposto de homogeneidade das variâncias pode, por vezes, ser corrigido através da transformação logarítmica dos dados. Caso a heterogeneidade das variâncias seja extrema e não possa ser corrigida por transformação, deve ponderar-se a possibilidade de utilizar métodos de análise das tendências como, por exemplo, o método degressivo de Jonkheere. Para mais orientações sobre a determinação da NOEC, consultar a referência (10).
62. Os avanços científicos mais recentes conduziram à recomendação de que fosse abandonado o conceito de NOEC, que deverá ser substituído pela estimativa dos valores de EC_x por regressão. No caso do presente ensaio com *Myriophyllum*, não foi definido nenhum valor ideal para «x». No entanto, o intervalo de 10-20 % parece ser apropriado (dependendo da variável de resposta escolhida), devendo ser comunicados, de preferência, tanto os valores de EC_{10} como de EC_{20} .

Relatórios

63. O relatório do ensaio inclui as seguintes informações:

Produto químico em estudo

Substância monocomponentes:

- aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas relevantes;
- dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc. (incluindo o teor de carbono orgânico, se for o caso).

Substância multicomponentes, UVCB ou mistura:

- caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Espécie de ensaio

- Nome científico e fonte.

Condições de ensaio

- Procedimento de ensaio utilizado (estático ou semiestático).
- Data de início do ensaio e respetiva duração.
- Meio de ensaio.
- Descrição do método experimental: recipientes e tampas utilizados no ensaio, volumes das soluções, comprimento do rebento principal em cada recipiente de ensaio, no início do mesmo.
- Concentrações de ensaio (nominais ou medidas, conforme adequado) e número de replicados por concentração.
- Métodos de preparação das soluções de reserva e de ensaio, incluindo a eventual utilização de solventes ou dispersantes.
- Temperatura durante o ensaio.
- Fonte luminosa, intensidade e homogeneidade da luz.
- Valores de pH dos meios de controlo e de ensaio.
- Método de análise do produto químico em estudo, juntamente com os dados adequados à avaliação da qualidade do método (estudos de validação, desvios-padrão ou intervalos de confiança das análises).
- Métodos para a determinação do comprimento do rebento principal e outras variáveis de medição, como, p. ex., o comprimento total dos ramos laterais, o comprimento total do rebento, o comprimento total da raiz, o peso fresco, o peso seco ou o número de verticilos.
- O estado da cultura (estéril ou não estéril) de cada recipiente de ensaio e de controlo, para cada momento de amostragem.
- Todos os desvios em relação ao presente método de ensaio.

Resultados

- Dados brutos: comprimento do rebento principal e outras variáveis de medição em cada recipiente de ensaio e de controlo, para cada momento de amostragem e momento de realização da análise.
- Médias e desvios-padrão para cada variável de medição.
- Curvas de crescimento para cada variável de medição.
- Variáveis de resposta calculadas para cada replicado exposto, com os respetivos valores médios e coeficiente de variação dos replicados.
- Representação gráfica da relação concentração/efeito.
- Estimativas dos pontos finais de toxicidade para as variáveis de resposta, por exemplo, EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀, e os intervalos de confiança associados. Se forem calculados, valores da LOEC e/ou da NOEC e métodos estatísticos utilizados para a respetiva determinação.
- Caso tenha sido efetuada uma análise ANOVA, dimensão do efeito detetado (por exemplo, diferenças menos significativas).
- Ocorrência de estimulação do crescimento observada em qualquer dos grupos expostos.
- Sinais visuais de fitotoxicidade, bem como quaisquer observações em relação às soluções de ensaio.
- Discussão dos resultados, incluindo qualquer influência nestes decorrente de alterações do presente método de ensaio.

REFERÊNCIAS

- (1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.
- (2) Maletzki, D. *et al.* (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch*, n.º 22, pp. 702–710.
- (3) Capítulo C.26 do presente anexo: *Ensaio de inibição de crescimento com Lemna sp.*
- (4) OCDE (2014), «*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system» OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, n.º 205, OECD Publishing, Paris.
- (5) OCDE (2000), «Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures» OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, n.º 23, OECD Publishing, Paris.
- (6) Capítulo C.51 do presente anexo: *Ensaio de toxicidade de Myriophyllum spicatum — água-sedimento*
- (7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.
- (8) Nyholm, N. *et al.* (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, pp. 157-167.
- (9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.
- (10) OCDE (2006), «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application» OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, n.º 54, OECD Publishing, Paris.
- (11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.
- (12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
- (13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.
- (14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.
- (15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.
- (16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Biomassa: peso fresco e/ou seco da matéria viva presente numa população. No presente ensaio, a biomassa é constituída pela soma do rebento principal, de todos os ramos laterais e de todas as raízes.

Produto químico: uma substância ou mistura.

Clorose: alteração de cor — de verde para amarelada — do organismo de ensaio, em especial dos verticilos.

EC_x: concentração do produto químico em estudo dissolvido no meio de ensaio que resulta numa redução de x % (por exemplo, 50 %) no crescimento de *Myriophyllum spicatum* num determinado período de exposição (que deverá ser explicitamente mencionado nos casos em que se afaste da duração total ou normal do ensaio). A fim de indicar de forma inequívoca se o valor de EC se refere à taxa de crescimento ou ao rendimento, o símbolo «E_rC» é utilizado no primeiro caso e o símbolo «E_cC» no segundo, sendo seguidos da designação da variável de medição utilizada, por exemplo, E_rC (comprimento do rebento principal).

Crescimento: aumento da variável de medição, por exemplo, comprimento do rebento principal, comprimento total dos ramos laterais, comprimento total do rebento, comprimento total da raiz, peso fresco, peso seco ou número de verticilos, no período de ensaio.

Taxa de crescimento (taxa média de crescimento específico): aumento logarítmico da variável de medição durante o período de exposição. *Nota:* As variáveis de resposta relacionadas com a taxa de crescimento são independentes da duração do ensaio desde que o padrão de crescimento dos organismos de controlo não expostos seja exponencial.

Menor concentração com efeito observável (LOEC): concentração mais baixa à qual se observa que o produto químico em estudo tem um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de redução do crescimento, quando comparada com o controlo, para um determinado período de exposição. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior ao verificado com a LOEC. Quando estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deverá ser fornecida uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, consequentemente, a NOEC).

Variáveis de medição: qualquer tipo de variável que seja medida para permitir a determinação do ponto final do ensaio, utilizando uma ou mais variáveis de resposta. No presente método de ensaio, o comprimento do rebento principal, o comprimento total dos ramos laterais; o comprimento total do rebento, o comprimento total da raiz, o peso fresco, o peso seco e o número de verticilos são variáveis de medição.

Monocultura: cultura com uma única espécie de planta.

Necrose: tecido morto (ou seja, branco ou castanho escuro) do organismo de ensaio.

Concentração sem efeitos observáveis (NOEC): concentração de ensaio imediatamente inferior à LOEC.

Variável de resposta: uma variável de estimativa da toxicidade, derivada de qualquer das variáveis medidas que descrevem a biomassa nos diferentes métodos de cálculo. No presente método de ensaio, a taxa de crescimento e o rendimento são variáveis de resposta derivadas de variáveis de medição como o comprimento do rebento principal, o comprimento total do rebento, o peso fresco, o peso seco ou o número de verticilos.

Ensaio semiestático (com renovação): ensaio em que a solução de ensaio é periodicamente substituída, em momentos específicos do ensaio.

Ensaio estático: ensaio durante o qual não há renovação da solução de ensaio.

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

Ponto final do ensaio: descreve, em termos gerais, o fator que será alterado pelo produto químico em estudo, por comparação com o controlo, e cuja identificação é o objetivo do ensaio. No presente método, o ponto final é a inibição do crescimento, que pode ser expressa por diferentes variáveis de resposta, baseadas em uma ou mais variáveis de medição.

Meio de ensaio: meio sintético completo de crescimento em que as plantas de ensaio são cultivadas quando expostas ao produto químico em estudo. Em geral, o produto químico em estudo é dissolvido no meio de ensaio.

UVCB: uma substância de composição desconhecida ou variável, produto de reação complexo ou material biológico.

Rendimento: valor de uma variável de medição que exprime a diferença entre a biomassa no final do período de exposição e o valor dessa variável de medição no início do período de exposição. Nota: quando o padrão de crescimento dos organismos não expostos é exponencial, as variáveis de resposta com base no rendimento diminuirão ao longo do ensaio.

Apêndice 2

MEIO DE CULTURA DE ANDREWS MODIFICADO PARA A CULTURA DE RESERVA E A PRÉ-CULTURA

A partir de cinco soluções de reserva de nutrientes, elaboradas separadamente, prepara-se o meio de cultura de Andrews modificado para a cultura de reserva e a pré-cultura, com adição de sacarose a 3 %.

Quadro 1

Composição da solução de nutrientes de Andrews: (Norma ASTM E 1913-04)

Produção de soluções de reserva de nutrientes			Produção da solução de nutrientes
Solução de reserva	Produto químico	Peso inicial por 1 000 ml	ml por 5 l de solução de nutrientes
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO ₃	8,08 g	
	Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	18,88 g	
2	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	9,86 g	50
3	Ver abaixo — solução de reserva 3.1		50
4	KH ₂ PO ₄	2,72 g	50
5	FeSO ₄ × 7 H ₂ O	0,278 g	50
	Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O	0,372 g	

As soluções de reserva podem ser conservadas num frigorífico durante seis meses (a 5-10 °C). Apenas a solução de reserva n.º 5 apresenta um prazo de validade reduzido (dois meses).

Quadro 2

Produção da solução de reserva 3.1 para a preparação da solução de reserva 3

Produto químico	Peso inicial g/100 ml
MnSO ₄ × 4 H ₂ O	0,223
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,115
H ₃ BO ₃	0,155
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,0125
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O	0,0037

Após a produção da solução de reserva 3.1 (quadro 2), esta solução deve ser congelada em alíquotas de cerca de 11 ml (pelo menos a – 18 °C). As porções ultracongeladas têm um prazo de validade de cinco anos.

Para produzir a solução de reserva 3, descongelar a solução de reserva 3.1, encher um balão volumétrico de 1 l com 10 ml da mesma e adicionar água ultrapura até ao traço de aferição do balão.

Para obter o meio de cultura de Andrews modificado, encher um balão volumétrico de 5 l com aproximadamente 2 500 ml de água ultrapura. Após adicionar 50 ml de cada solução de reserva, encher 90 % do balão volumétrico com água ultrapura e estabelecer um pH de 5,8.

Em seguida, adicionar 150 g de sacarose dissolvida (3 % por 5 l); seguidamente, encher o balão volumétrico com água ultrapura até ao traço de aferição. Por último, enchem-se frascos de Schott de 1 l com a solução de nutrientes que é esterilizada em autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

A solução de nutrientes produzida deste modo pode ser mantida esterilizada num frigorífico (a 5-10 °C) durante três meses.

Meio de cultura de Andrews modificado para ensaio de toxicidade sem sedimentos

Das cinco soluções de reserva de nutrientes já referidas nos quadros 1 e 2, será preparado um meio de cultura de Andrews modificado e dez vezes concentrado para obter as soluções de ensaio, com a adição de sacarose a 30 %. Para tal, encher um balão volumétrico de 1 l com aproximadamente 100 ml de água ultrapura. Após a adição de 100 ml de cada uma das soluções de reserva, estabelecer um pH de 5,8. Em seguida, adicionar sacarose dissolvida a 30 % (300 g por 1 000 ml); seguidamente, encher o balão volumétrico com água ultrapura até ao traço de aferição.

Por último, enchem-se frascos de Schott de 0,5 l com a solução de nutrientes que é esterilizada em autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

A solução de nutrientes modificada e dez vezes concentrada produzida deste modo pode ser mantida esterilizada num frigorífico (a 5-10 °C) durante três meses.

Apêndice 3

CONSERVAÇÃO DAS CULTURAS DE RESERVA

No presente apêndice 3, descreve-se a cultura de reserva de *Myriophyllum spicatum* L ⁽¹⁾, uma dicotiledónea subaquática da família da pinheirinha-de-água. Entre junho e agosto, flores rosa-esbranquiçadas impercetíveis assomam acima da superfície da água. As plantas estão enraizadas no solo por um sistema sólido de rizomas e podem ser encontradas em águas eutróficas não poluídas e em águas minerais mais calcificadas com substrato enlameado, em todo o hemisfério norte. A espécie *Myriophyllum spicatum* prefere água doce, mas também é encontrada em águas salobras.

São necessárias plantas estéreis para uma cultura de reserva sem sedimentos em condições laboratoriais. As plantas estéreis encontram-se disponíveis no laboratório de ecotoxicologia do *Umweltbundesamt* (Agência Federal do Ambiente) da Alemanha.

Em alternativa, é possível preparar organismos de ensaio a partir de plantas não estéreis em conformidade com a norma ASTM E 1913-04. Ver abaixo — extraído do guia da ASTM — o procedimento de cultura de *Myriophyllum sibiricum* recolhida no campo:

«Caso se utilizem plantas não estéreis recolhidas no campo, recolher turiões de *M. sibiricum* no outono. Colocar os turiões num aquário de 20 l com 5 cm de sedimentos estéreis cobertos por areia silicosa ou, por exemplo, Turface® e 18 l de água com baixo teor de carbono. Arejar o aquário e mantê-lo a uma temperatura de 15 °C e um caudal de 200 a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 16 h por dia. A cultura de plantas no aquário pode ser conservada como fonte de reserva de plantas, caso as culturas de plantas estéreis sejam destruídas por uma anomalia mecânica na estufa de crescimento, por contaminação ou por outro motivo. As plantas cultivadas no aquário não são estéreis e as culturas estéreis não podem ser conservadas num sistema de cultura descontínua. Para esterilizar a cultura, as plantas são removidas do aquário e enxaguadas com um fluxo de água desionizada durante cerca de 0,5 h. Em condições assépticas numa câmara de fluxo de ar laminar, as plantas são desinfetadas durante menos de 20 minutos — até que a maior parte do tecido vegetal se encontre branqueada e apenas o ápice em crescimento permaneça verde — numa solução de hipoclorito de sódio a 3 % (m/v) com 0,01 % de um tensioativo adequado. Agitar o desinfetante e o material vegetal. Os segmentos com vários nós são transferidos para tubos de cultura estéreis com 45 ml de meio de cultura de Andrews modificado e esterilizado tapados com tampas simples. Coloca-se apenas um segmento da planta em cada câmara de ensaio. Utiliza-se película vedante de laboratório para assegurar que o recipiente se mantém fechado. Após o estabelecimento de uma cultura estéril, os segmentos de planta que contêm vários nós devem ser transferidos para novas câmaras de ensaio com novos meios de nutrientes líquidos a cada dez a doze dias. Tal como demonstrado pela cultura em placas de ágar, as plantas devem ser esterilizadas e permanecer estéreis durante oito semanas antes de ser possível dar início ao ensaio.»

Uma vez que o meio de cultura de Andrews modificado contém sacarose (que estimula o crescimento de fungos e bactérias), todos os materiais, soluções e culturas devem ser preparados em condições estéreis. Todos os líquidos, bem como o equipamento, são esterilizados antes da utilização. A esterilização é efetuada por tratamento com ar aquecido (210 °C), durante 4 horas, ou em autoclave, durante 20 minutos a 121 °C. Além disso, todos os frascos, pratos, vasos, etc., e outros equipamentos, são submetidos a tratamento à chama na bancada de trabalho estéril imediatamente antes da utilização.

As culturas de reserva podem ser conservadas a iluminação reduzida e baixa temperatura (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20 $\pm$ 2 °C) por longos períodos, sem que seja necessário proceder à sua transferência periódica. O meio de crescimento de *Myriophyllum* deve ser o mesmo que é utilizado para os ensaios, mas as culturas de reserva também podem ser conservadas noutros meios ricos em nutrientes.

Os segmentos de plantas são distribuídos em culturas puras em vários balões de Erlenmeyer de 500 ml ou/e balões de Fernbach de 2 000 ml, cada um com aproximadamente 450 ml ou/e 1 000 ml, respetivamente, de meio de cultura de Andrews modificado. Em seguida, os balões são fechados em cultura pura com um tampão de celulose.

Além disso, é absolutamente necessário submeter o equipamento a tratamento à chama na bancada de trabalho estéril, imediatamente antes da utilização. Consoante o número e a dimensão, as plantas devem ser transferidas para novas soluções de nutrientes aproximadamente de três em três semanas.

É possível utilizar os ápices, bem como segmentos da parte central do caule, para esta renovação da cultura. O número e a dimensão das plantas transferidas (ou dos segmentos das plantas) dependem do número de plantas necessárias. Por exemplo, é possível transferir cinco segmentos de rebentos para um balão de Fernbach e três segmentos de rebentos para um balão de Erlenmeyer, cada um dos quais com um comprimento de 5 cm. Devem rejeitar-se todas as partes enraizadas, em fase de floração, mortas ou com outras características visíveis deste tipo.

⁽¹⁾ Carl von Linné (*Råshult /Älmhult, 23 de maio de 1707.; † Uppsala, 10 de janeiro de 1778).

Figura 1

Corte de plantas para a pré-cultura e a cultura de reserva após três semanas de cultura.



A cultura das plantas deve ser efetuada em balões de Erlenmeyer de 500 ml e balões de Fernbach de 2 000 ml numa incubadora refrigerada a 20 ± 2 °C com luz contínua a aproximadamente $100\text{-}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ou 6 000-9 000 Lux (emitida por iluminação da câmara com a temperatura cromática «luz branca quente»).

Figura 2

Cultura de plantas numa incubadora refrigerada com iluminação da câmara.



Devem utilizar-se frascos de cultura quimicamente limpos (lavados com ácido) e estéreis e técnicas de manuseamento em condições de assepsia. Em caso de contaminação da cultura de reserva, por exemplo, por algas, fungos e/ou bactérias, deve preparar-se uma nova cultura ou deve utilizar-se uma cultura de reserva de outro laboratório para a renovação dessa cultura.

Apêndice 4

MANUTENÇÃO DA PRÉ-CULTURA E PREPARAÇÃO DO ORGANISMO PARA O ENSAIO

Para obter a pré-cultura, cortar rebentos da cultura de reserva em segmentos com dois verticilos cada; colocar os segmentos em balões de Fernbach com meio de cultura de Andrews modificado (com sacarose a 3 %). Cada balão pode conter, no máximo, 50 segmentos de rebentos. Todavia, é necessário tomar precauções para que os segmentos estejam vivos e não apresentem quaisquer raízes nem ramos laterais ou botões (ver figura 1 no apêndice 3).

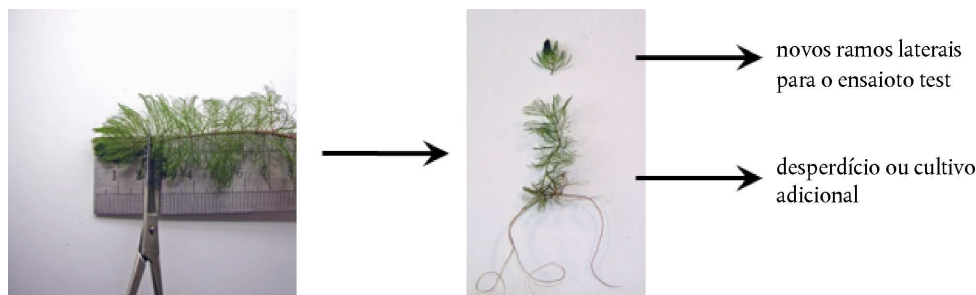
Os organismos da pré-cultura são cultivados durante 14 a 21 dias em condições estéreis, numa câmara com ambiente condicionado com fases alternadas de luz/obscuridade de 16/8 horas. Intensidade da luz selecionada da gama de $100\text{--}150\ \mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. A temperatura dos recipientes de ensaio deve ser mantida a $23 \pm 2\ ^\circ\text{C}$.

Uma vez que o meio de cultura de Andrews modificado contém sacarose — que estimula o crescimento de algas, fungos e bactérias —, as soluções do produto químico devem ser preparadas e cultivadas em condições estéreis. Todos os líquidos, bem como o equipamento, são esterilizados antes da utilização. A esterilização é efetuada por tratamento com ar aquecido ($210\ ^\circ\text{C}$), durante 4 horas, ou em autoclave, durante 20 minutos a $121\ ^\circ\text{C}$. Além disso, todos os frascos, pratos, vasos, etc., e outros equipamentos, são submetidos a tratamento à chama na bancada de trabalho estéril imediatamente antes da utilização.

Os rebentos são removidos em cultura pura dos frascos de pré-cultura, selecionando-se material tão homogêneo quanto possível. Cada ensaio exige, pelo menos, 60 organismos de ensaio (ensaio com oito concentrações do produto químico em estudo). Para o ensaio, retiram-se novos ramos laterais das pré-culturas, estes são encurtados para 2,5 cm desde a base (medidos com régua) e transferidos para um copo com meio de Andrews modificado e estéril. Estes novos ramos laterais podem ser utilizados para o ensaio de toxicidade em *Myriophyllum spicatum* sem sedimentos.

Figura 2

Corte de plantas da pré-cultura para o ensaio de toxicidade em *Myriophyllum spicatum* sem sedimentos.



C.51 Ensaio de toxicidade de *Myriophyllum spicatum* água-sedimento**INTRODUÇÃO**

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline 239* (2014) da OCDE. Encontram-se disponíveis métodos de ensaio para monocotiledóneas aquáticas flutuantes, para a espécie *Lemna* (1) e para espécies de algas (2). Estes métodos são habitualmente utilizados para gerar dados relativos ao risco dos produtos químicos em estudo, em especial dos produtos químicos com atividade herbicida, para as espécies de plantas aquáticas não visadas. Contudo, em alguns casos, podem ser necessários dados para espécies de macrófitos adicionais. As orientações recentes publicadas com base nas sessões de trabalho da Sociedade de Toxicologia e Química Ambiental (SETAC) sobre a avaliação dos riscos dos pesticidas para os macrófitos aquáticos (AMRAP) sugeriram que podem ser necessários dados respeitantes a uma espécie de macrófitos enraizados, no que se refere aos produtos químicos a cujo modo de ação se saiba que a *Lemna* e as algas não são sensíveis, ou se a partição do sedimento constituir uma preocupação, conduzindo à exposição através da absorção pela raiz (3). Com base no conhecimento e experiência atuais, a *Myriophyllum* spp foi selecionada como a espécie preferível nos casos em que são necessários dados respeitantes a uma dicotiledónea enraizada e subaquática (4) (5) (6). Este ensaio não substitui outros ensaios de toxicidade em meio aquático; deverá, isso sim, complementá-los de modo a possibilitar uma avaliação mais completa dos riscos e dos perigos para a planta aquática. O método de ensaio de *Myriophyllum spicatum* água-sedimento complementa o ensaio de toxicidade de *Myriophyllum spicatum* sem sedimentos (7).
2. O presente documento descreve um método de ensaio que permite a avaliação dos efeitos de um produto químico na espécie aquática enraizada *Myriophyllum spicatum*, cultivada num sistema água-sedimento. O método de ensaio baseia-se parcialmente em métodos existentes (1) (2) (8) e tem em conta as investigações recentes relacionadas com a avaliação de risco das plantas aquáticas (3). O método água-sedimento foi validado por um estudo interlaboratorial internacional realizado com a espécie *Myriophyllum* cultivada em condições estáticas, exposta ao produto químico em estudo mediante aplicações efetuadas através da coluna de água (9). Todavia, o sistema de ensaio é facilmente adaptado para permitir a exposição através de sedimentos enriquecidos ou da fase aquosa, em cenários semiestáticos ou de dose pulsada, embora estes cenários não tenham sido formalmente objeto de estudos interlaboratoriais. Além disso, o método geral pode ser utilizado para outras espécies enraizadas, subaquáticas e anfíbias, nomeadamente outras espécies *Myriophyllum* — p. ex., *Myriophyllum aquaticum* — e *Glyceria maxima* (10). Pode ser necessário efetuar alterações às condições, à conceção e à duração do ensaio para espécies alternativas. Designadamente, é necessário envidar esforços adicionais para definir procedimentos adequados aplicáveis ao *Myriophyllum aquaticum*. Estas opções não são apresentadas em pormenor no presente método de ensaio, que descreve a abordagem-padrão para a exposição de *Myriophyllum spicatum* num sistema estático através da fase aquosa.
3. Este método de ensaio aplica-se a substâncias em relação às quais tenha sido validado — para mais pormenores, ver o relatório do estudo interlaboratorial (9) — ou a formulações, ou misturas conhecidas. É possível efetuar um ensaio de *Myriophyllum* para cumprir um requisito de dados de nível 1 desencadeado por possíveis problemas relativos à partição do produto químico no sedimento ou ao modo de ação/seletividade. De igual modo, pode ser necessário realizar um ensaio laboratorial em *Myriophyllum* no contexto de uma estratégia de nível superior para lidar com preocupações relacionadas com o risco para as plantas aquáticas. O motivo específico para a realização de um ensaio determinará a via de exposição (por exemplo, através da água ou do sedimento). Antes da aplicação do presente método para o ensaio de uma mistura com fins regulamentares, importa ponderar se, e em caso afirmativo, por que motivo, o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito regulamentar para o ensaio da mistura.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

4. O ensaio foi concebido para avaliar os efeitos dos produtos químicos no crescimento vegetativo de plantas *Myriophyllum* cultivadas em meios normalizados (água, sedimentos e nutrientes). Para o efeito, ápices de rebentos de plantas saudáveis que não se encontrem em estado de floração são incorporados num sedimento artificial normalizado, complementado com nutrientes adicionais a fim de garantir o crescimento adequado das plantas, e posteriormente conservados em meio de Smart e Barko (apêndice 1). Após um período de estabelecimento, para permitir a formação de raízes, as plantas são expostas a uma série de concentrações de ensaio adicionadas à coluna de água. Em alternativa, é possível simular a exposição através do sedimento mediante o enriquecimento do sedimento artificial com o produto químico em estudo e a transferência das plantas para o sedimento enriquecido. Em ambos os casos, as plantas são subseqüentemente mantidas em condições ambientais controladas durante 14 dias. Os efeitos sobre o crescimento são determinados a partir de avaliações quantitativas do comprimento, do peso fresco e do peso seco do rebento, bem como de observações qualitativas de sintomas como clorose, necrose ou deformidades de crescimento.

5. Para quantificar os efeitos relacionados com o produto químico em estudo, compara-se o crescimento nas soluções de ensaio com o crescimento das plantas de controlo e determina-se a concentração que causa uma inibição de x % no crescimento, expressa como EC_x : « x » pode ser qualquer valor dependente dos requisitos regulamentares — p. ex., EC_{10} , EC_{20} e EC_{50} . De notar que as estimativas dos valores de EC_{10} e EC_{20} são apenas fiáveis e adequadas nos ensaios em que os coeficientes de variação nas plantas do controlo sejam inferiores ao nível de efeito estimado, ou seja, os coeficientes de variação devem ser < 20 % para a estimativa sólida de uma EC_{20} .
6. Deve determinar-se tanto a taxa média de crescimento específico (calculada com base em avaliações do comprimento, do peso fresco e do peso seco do rebento) como o rendimento (calculado com base no aumento do comprimento, do peso fresco e do peso seco do rebento) das plantas tratadas e não tratadas. A taxa de crescimento específico (r) e o rendimento (y) são posteriormente utilizados para determinar a $E_r C_x$ (p. ex., $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) e a $E_y C_x$ (p. ex., $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$), respetivamente.
7. Se necessário, a menor concentração com efeito observável (LOEC) e a concentração sem efeitos observáveis (NOEC) podem ser determinadas estatisticamente a partir das estimativas do rendimento e das taxas médias de crescimento específico.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

8. Deve utilizar-se um método analítico com sensibilidade adequada para a quantificação dos produtos químicos no meio de ensaio.
9. As informações sobre o produto químico em estudo que podem ser úteis para estabelecer as condições do ensaio são, entre outras, a fórmula estrutural, a composição — no caso de substâncias multiconstituintes, UVCB, misturas ou formulações —, a pureza, a solubilidade em água, a estabilidade à luz e em água, a constante de dissociação (pK_a), o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), o K_d dos sedimentos — se conhecido —, a pressão de vapor e a biodegradabilidade. A solubilidade em água e a pressão de vapor podem ser utilizadas para calcular a constante da Lei de Henry, que permitirá verificar a probabilidade de perdas significativas do produto químico em estudo durante o período de ensaio. Caso sejam prováveis perdas dos produtos químicos, as mesmas devem ser quantificadas, devendo documentar-se os procedimentos subsequentes para as controlar. Nos casos em que as informações sobre a solubilidade e a estabilidade do(s) produto(s) químico(s) em estudo forem imprecisas, recomenda-se que estas propriedades sejam avaliadas nas condições do ensaio, ou seja, com os mesmos meio de cultura, temperatura e regime de iluminação que se utilizarão no ensaio. *Nota:* Sempre que se ensaiem herbicidas peroxidantes com dependência da luz, a iluminação laboratorial utilizada deve conter luz solar ultravioleta equivalente à presente na luz solar natural.
10. O pH deve ser medido e adaptado ao meio de ensaio, conforme adequado. O controlo do pH do meio é particularmente importante, por exemplo, no caso dos ensaios com metais ou produtos químicos hidroliticamente instáveis. Para mais pormenores sobre o ensaio de produtos químicos cujas propriedades físico-químicas dificultam o ensaio, consultar o documento de orientações da OCDE (11).

VALIDADE DO ENSAIO

11. Para que os resultados do ensaio sejam válidos, o comprimento total médio dos rebentos e o peso fresco total médio dos rebentos nas plantas de controlo devem, pelo menos, duplicar durante a fase de exposição. Além disso, as plantas de controlo não devem apresentar quaisquer sintomas visuais de clorose e devem encontrar-se visivelmente livres de contaminação por outros organismos como algas e/ou películas bacterianas nas plantas, na superfície do sedimento e no meio de ensaio.
12. O coeficiente médio de variação do rendimento, com base em medições do peso fresco do rebento (ou seja, do início ao fim do ensaio), nas culturas de controlo, não deve exceder 35 % entre os replicados.

PRODUTO QUÍMICO DE REFERÊNCIA

13. Para verificar o desempenho do procedimento de ensaio ao longo do tempo, deve ensaiar-se periodicamente um ou mais produtos químicos de referência, como o 3,5-diclorofenol (3,5-DCP), utilizado no estudo interlaboratorial (9). Os dados do estudo interlaboratorial indicam que os valores médios de EC_{50} do 3,5-DCP para as diferentes variáveis de resposta se situavam entre 4,7 mg/l e 6,1 mg/l (ver o relatório do estudo interlaboratorial para informações sobre o intervalo de confiança previsto a partir destes valores). É aconselhável submeter a ensaio um produto químico de referência pelo menos duas vezes por ano ou, se os ensaios forem realizados com pouca frequência, em paralelo com os ensaios de toxicidade definitivos. O relatório estatístico do estudo interlaboratorial internacional apresenta um guia para os valores de EC_{50} previstos para 3,5-DCP (9).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Equipamento de ensaio

14. O ensaio deve ser realizado em condições ambientais controladas, ou seja, numa câmara de crescimento, sala de crescimento ou laboratório, com fotoperíodo, iluminação e temperatura controláveis (ver secção «Condições de ensaio», pontos 56-58). As culturas de reserva devem ser conservadas separadamente dos recipientes de ensaio.
15. O estudo deve ser realizado com recipientes de ensaio de vidro, tais como aquários ou copos; costumam utilizar-se copos de vidro de 2 l (aproximadamente 24 cm de altura e 11 cm de diâmetro). Todavia, podem ser adequados outros recipientes (de maior dimensão), desde que a profundidade da água seja suficiente para permitir o crescimento ilimitado e manter as plantas submersas durante toda a duração do ensaio.
16. Como recipientes para incorporar as plantas no sedimento, podem utilizar-se vasos de plástico ou vidro, com cerca de 9 cm de diâmetro, 8 cm de altura e 500 ml de volume. Em alternativa, é possível utilizar copos de vidro, que são preferíveis em alguns casos (por exemplo, ensaio de produtos químicos hidrófobos ou com K_{ow} elevado).
17. A seleção das dimensões do vaso/copo deve ser ponderada a par da seleção dos recipientes de ensaio e da conceção de ensaio preferível — ver abaixo. Caso se utilize o ensaio A (um rebento por vaso com três vasos por recipiente) podem ser necessários vasos de menor dimensão ou recipientes de maior dimensão. Caso se utilize o ensaio B (três rebentos por vaso e um vaso por recipiente) a dimensão dos referidos vaso e recipiente deve ser adequada. Em todos os casos, a profundidade mínima de água sobreposta deve encontrar-se 12 cm acima do topo do sedimento e o rácio volume/superfície do sedimento para o volume/superfície da água deve ser registado.

Organismo de ensaio

18. As abordagens gerais descritas no presente método de ensaio podem ser utilizadas para proceder ao ensaio de uma série de espécies de plantas aquáticas. Contudo, as condições descritas no presente método de ensaio foram adaptadas para o ensaio da espécie pinheirinha-de-água, *Myriophyllum spicatum*. Esta espécie pertence à família das dicotiledóneas, *Haloragaceae*.
19. A *Myriophyllum spicatum* (pinheirinha-de-água eurasiática) é uma espécie subaquática e enraizada que tolera um amplo conjunto de condições e se encontra em massas de água estáticas e correntes. A *M. spicatum* é uma planta perene que se reduz apenas à raiz no inverno. Normalmente, as plantas florescem e fixam sementes livremente, embora a propagação vegetativa através de botões complementares ou fragmentos de ramos que se separam naturalmente ou após perturbações seja muitas vezes o principal método de colonização.

Cultura do organismo de ensaio

20. As plantas podem ser obtidas de populações naturais ou através de fornecedores de plantas aquáticas. Em ambos os casos, a origem das plantas deve ser documentada e a identidade da espécie deve ser verificada. É necessário tomar precauções especiais para garantir que é obtida a espécie correta na recolha de *Myriophyllum spicatum* no campo, especialmente nas regiões em que esta é capaz de se cruzar com outras espécies de *Myriophyllum*. Em caso de dúvida, recomenda-se a utilização de culturas laboratoriais verificadas provenientes de fontes conhecidas. As plantas que tenham sido expostas a contaminantes químicos ou recolhidas de locais poluídos não devem ser utilizadas no presente ensaio.
21. Nas regiões em que a *M. spicatum* não se encontre prontamente disponível durante os meses de inverno, pode ser necessária a manutenção de culturas de reserva a longo prazo em condições laboratoriais ou em estufa. As culturas de reserva devem ser mantidas em condições semelhantes às condições de ensaio, embora seja possível reduzir a irradiação e a temperatura com vista a diminuir a frequência da manutenção das culturas (por exemplo, quando não estejam previstos ensaios em *Myriophyllum* durante um determinado período). Recomenda-se a utilização de aquários e vasos de maior dimensão do que a que seria utilizada nos ensaios, de modo a proporcionar espaço para a proliferação. A composição do sedimento e do meio aquático deve ser a mesma que a utilizada para os ensaios, embora seja possível adotar métodos alternativos de fertilização do sedimento (por exemplo, utilização de fórmulas fertilizantes comerciais de libertação lenta).

22. As plantas de reserva devem estar visivelmente livres de contaminação por quaisquer outros organismos, a saber, caracóis, algas filamentosas, fungos e insetos, por exemplo, ovos ou larvas da traça *Paraponyxa stratiotata* e larvas ou adultos dos curculionídeos *Eubrychius velutus*. O enxaguamento do material vegetal em água fresca pode ser necessário para eliminar contaminações visíveis. Além disso, devem envidar-se esforços para minimizar o desenvolvimento de contaminação por algas unicelulares e bactérias, embora não seja necessária a esterilidade total do material vegetal. As culturas de reserva devem ser monitorizadas e transplantadas conforme necessário a fim de evitar o desenvolvimento de contaminação por algas ou bactérias. O arejamento das culturas de reserva pode ser benéfico caso a contaminação por algas ou bactérias se torne problemática.
23. Em todos os casos, as plantas são cultivadas/aclimatadas em condições semelhantes, mas não necessariamente idênticas, às utilizadas no ensaio durante um período adequado (ou seja, > 2 semanas) antes da sua utilização num ensaio.
24. As culturas de reserva em fase de floração não devem ser utilizadas nos ensaios, uma vez que, em geral, as taxas de crescimento vegetativo diminuem durante a apóse a fase de floração.

Sedimento

25. Recomenda-se que sejam utilizados no presente ensaio sedimentos formulados com a seguinte composição, baseada na do sedimento artificial utilizado no capítulo C.28 do presente anexo 8. O sedimento é preparado conforme descrito no método de ensaio C.28, com a exceção da adição de nutrientes como descrito abaixo:
 - a) 4-5 % de turfa (peso seco, $2 \pm 0,5$ % de carbono orgânico) com pH tão próximo quanto possível de 5,5 a 6,0; é importante utilizar turfa na forma pulverulenta, finamente moída (de preferência, uma granulometria < 1 mm) e apenas seca ao ar.
 - b) 20 % (peso seco) de argila caulínica, de preferência com teor de caulinite superior a 30 %.
 - c) 75-76 % (peso seco) de areia quartzítica (com predominância de areia fina com mais de 50 % de partículas de granulometria compreendida entre 50 e 200 μm).
 - d) Adiciona-se um meio nutriente aquoso para que o lote de sedimento final contenha 200 mg/kg de sedimento seco de cloreto de amónio e fosfato de sódio e o teor de humidade da mistura final se encontre num intervalo de 30-50 %.
 - e) A quantidade de carbonato de cálcio (CaCO_3) quimicamente puro necessária para ajustar o pH da mistura final dos sedimentos a $7,0 \pm 0,5$.
26. As fontes da turfa, da argila caulínica e da areia devem ser conhecidas e documentadas. Caso a origem seja desconhecida ou acarrete algum nível de preocupação, os respetivos componentes devem ser verificados para determinar a ausência de contaminação química (por exemplo, metais pesados, compostos organoclorados, compostos organofosforados).
27. Os componentes secos do sedimento devem ser misturados de forma homogénea antes da mistura vigorosa da solução de nutrientes aquosa no sedimento. O sedimento húmido deve ser preparado pelo menos dois dias antes da utilização, a fim de permitir a imersão completa da turfa e prevenir a flutuação de partículas de turfa hidrófobas até à superfície quando o sedimento é sobreposto com o meio; antes da utilização, o sedimento húmido pode ser conservado ao abrigo da luz.
28. Para o ensaio, o sedimento é transferido para recipientes de dimensão adequada, tais como vasos de um diâmetro inferior ao dos recipientes de vidro (a superfície do sedimento deve cobrir aproximadamente 70 %, ou mais, da superfície do recipiente). Nos casos em que o recipiente tenha orifícios no fundo, um pedaço de papel de filtro no fundo do recipiente ajudará a manter o sedimento no mesmo. Enchem-se os vasos com o sedimento de modo a que a superfície deste esteja nivelada, antes da sua cobertura com uma camada fina (~ 2 a 3 mm) de um material inerte como areia ou gravalha fina de horticultura (ou coral esmagado), a fim de manter o sedimento no lugar.

Meio de ensaio

29. Recomenda-se o meio de Smart e Barko (12) para a cultura e o ensaio de *Myriophyllum spicatum*. A preparação deste meio é descrita no apêndice 1. Para um crescimento ótimo das plantas, o pH do meio (fase aquosa) no início do ensaio deve situar-se entre 7,5 e 8,0.

Conceção experimental

30. O ensaio deve integrar, no mínimo, seis recipientes de ensaio de replicados para o controlo não tratado e, no mínimo, quatro recipientes de ensaio de replicados para cada um de um mínimo de cinco níveis de concentração.
31. Caso não seja necessário determinar a NOEC, o ensaio poderá ser alterado de modo a aumentar o número de concentrações estudadas, reduzindo o número de replicados por concentração.
32. Cada recipiente de ensaio representa um replicado com três rebentos. Existem duas opções para o cultivo de três rebentos em cada recipiente de ensaio:
 - Ensaio A: um rebento por vaso e três vasos por recipiente.
 - Ensaio B: três rebentos por vaso e um vaso por recipiente.
 - São aceitáveis ensaios alternativos com um rebento por vaso por recipiente de ensaio, desde que a replicação seja ajustada conforme necessário a fim de atingir os critérios de validade exigidos.
33. Cada recipiente de ensaio deve ser repartido aleatoriamente pelos grupos de ensaio. A colocação aleatória dos frascos na zona de ensaio é necessária para reduzir ao mínimo a influência das diferenças espaciais em termos de intensidade da luz ou de temperatura.

Concentrações do produto químico em estudo e grupos de controlo

34. Em regra, as concentrações devem seguir uma progressão geométrica; o fator de separação entre as concentrações de ensaio não deve ser superior a 3,2. O conhecimento prévio da toxicidade do produto químico em estudo, determinada com base nos resultados de ensaios de determinação da gama de concentrações, permite uma mais fácil escolha das concentrações a utilizar no ensaio.
35. Para a determinação de uma EC_x , as concentrações de ensaio devem abranger a EC_x , de modo a garantir um nível de confiança apropriado. Por exemplo, para a determinação da EC_{50} , a concentração de ensaio mais elevada deve ser superior ao valor de EC_{50} . Se o valor de EC_{50} se situar fora da gama de concentrações ensaiadas, os intervalos de confiança associados serão maiores, o que poderá impossibilitar o ajustamento de um modelo estatístico. A utilização de mais concentrações de ensaio aumentará o intervalo de confiança relativo ao valor de EC_x resultante.
36. Para determinar a LOEC/NOEC (ponto final facultativo), a concentração mais baixa ensaiada deve ser suficientemente fraca para que o crescimento não seja significativamente diferente do crescimento nas plantas de controlo. Por outro lado, a concentração mais elevada a ensaiar deve ser suficientemente elevada para que o crescimento seja significativamente inferior ao do controlo. A utilização de mais replicados aumentará o poder estatístico da conceção concentração-sem efeito/ANOVA.

Ensaio no limite

37. Nos casos em que um ensaio de determinação da gama de concentrações indique que o produto químico em estudo não apresenta efeitos tóxicos em concentrações até 100 mg/l ou até ao seu limite de solubilidade no meio de ensaio, ou ainda, no caso de uma fórmula, até ao limite de capacidade de dispersão, pode proceder-se a um ensaio no limite para facilitar a comparação das respostas de um grupo de controlo e de um grupo exposto ao produto químico em estudo (a uma concentração de 100 mg/l ou que corresponda ao limite de solubilidade, ou de 1 000 mg/kg de sedimento seco). Este ensaio deve seguir os princípios gerais de um ensaio-padrão dose-resposta, com a exceção de se recomendar um aumento do número mínimo de replicados para seis recipientes de ensaio por controlo e concentração. O crescimento dos grupos de controlo e de exposição pode ser analisado através de um ensaio estatístico de comparação das médias, como, por exemplo, o teste t de Student.

Soluções de ensaio

38. Em geral, as soluções de ensaio são preparadas por diluição de uma solução de reserva, preparada através da dissolução ou dispersão do produto químico em meio de Smart e Barko, com água desmineralizada (ou seja, água destilada ou desionizada (ver apêndice 1)).

39. Regra geral, a concentração de ensaio mais elevada não deve exceder a solubilidade em água do produto químico em estudo ou, no caso de fórmulas, a capacidade de dispersão nas condições de ensaio.
40. No caso de produtos químicos com baixa solubilidade em água, poderá ser necessário preparar uma solução de reserva concentrada ou dispersar o produto por meio de um dispersante ou solvente orgânico, de modo a facilitar a adição de quantidades exatas do produto químico ao meio de ensaio e as suas dispersão e dissolução. Devem ser evitados todos os esforços para evitar utilizar solventes ou dispersantes desse tipo. A utilização de dispersantes ou de solventes auxiliares não deverá acarretar qualquer fitotoxicidade. A acetona e a dimetilformamida, por exemplo, incluem-se entre os solventes mais comuns que não causam fitotoxicidade em concentrações até 100 µl/l. Caso se utilize um solvente ou dispersante, a sua concentração final deve ser registada e reduzida ao mínimo (≤ 100 µl/l). Nestas circunstâncias, todos os tratamentos e controlos (do solvente) devem conter a mesma concentração de solvente ou dispersante. Os replicados do controlo não tratado que não contenham um solvente ou dispersante também são integrados no ensaio. Para mais orientações sobre a utilização de dispersantes, consultar o documento de orientação da OCDE (11).

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

41. O procedimento de ensaio varia em função da via de aplicação do produto químico em estudo (ou seja, através da fase aquosa ou sedimentar). O comportamento provável do produto químico em estudo num sistema água-sedimento deve ser tido em conta para fundamentar a escolha do regime de exposição utilizado no ensaio (ou seja, renovação estática ou semiestática, água enriquecida ou sedimento enriquecido). Os ensaios com sedimento enriquecido podem ser preferíveis em alguns casos, no que se refere aos produtos químicos nos quais se prevê observar uma partição significativa no sedimento.

Fase de estabelecimento

42. São cortados das plantas de cultura ápices/pontas de rebentos saudáveis, ou seja, sem rebentos laterais, para obter rebentos com um comprimento de 6 cm (± 1 cm). Para o ensaio A (um rebento por vaso e três vasos por recipiente) uma única ponta do rebento é plantada em cada vaso. Para o ensaio B (três rebentos por vaso e um vaso por recipiente) quatro a cinco ápices do rebento são plantados em cada vaso com o sedimento.
43. Em ambos os casos devem ser plantados vasos adicionais para permitir a seleção de plantas uniformes no início do ensaio, bem como para proporcionar plantas de reserva a utilizar para a inspeção do crescimento de raízes imediatamente antes do tratamento e plantas de reserva a colher para medições da biomassa e do comprimento dos rebentos no dia 0.
44. Os rebentos são inseridos de modo a que cerca de 3 cm — cobrindo pelo menos dois nós — se encontrem abaixo da superfície do sedimento.
45. Subsequentemente, os vasos são transferidos para os recipientes de ensaio nas mesmas condições ambientais utilizadas na fase de exposição e conservados durante sete dias em meio de Smart e Barko para induzir o desenvolvimento das raízes.
46. Após este período, várias plantas dos vasos de reserva devem ser removidas para inspeção do crescimento das raízes. Caso o crescimento das raízes não seja visível (ou seja, as pontas das raízes não sejam visíveis), a fase de estabelecimento deve ser prorrogada até que o crescimento das raízes seja visível. Recomenda-se este passo a fim de garantir que as plantas se encontram em crescimento ativo no momento do início do ensaio.

Seleção de material vegetal uniforme

47. No que se refere ao ensaio A (um rebento por vaso e três vasos por recipiente) os vasos são selecionados com base na uniformidade antes do início do ensaio. No caso do ensaio B (três rebentos por vaso e um vaso por recipiente), as plantas de reserva são removidas para deixar três plantas de dimensão e aspeto uniformes.

Exposição através da fase aquosa

48. Os vasos, selecionados com base na uniformidade, são colocados nos recipientes de ensaio, tal como exigido pela conceção experimental. O meio de Smart e Barko é então adicionado aos recipientes de ensaio. Devem tomar-se precauções para evitar perturbações do sedimento. Para este efeito, o meio pode ser adicionado com um funil ou um disco de plástico que cubra o sedimento enquanto o meio é vertido nos recipientes de ensaio, desde que o disco seja removido imediatamente depois. Em alternativa, os vasos das plantas podem ser colocados nos recipientes de ensaio após a adição do meio. Em ambos os casos, é possível utilizar um novo meio no início da fase de exposição, se necessário para minimizar a potencial acumulação de algas e bactérias ou para permitir a preparação de lotes únicos da solução de ensaio nos replicados.
49. Mede-se o comprimento do rebento acima do sedimento, quer antes quer depois da adição do meio.
50. As quantidades adequadas do produto químico em estudo podem ser adicionadas ao meio de ensaio antes da introdução deste nos recipientes de ensaio. Em alternativa, o produto químico em estudo pode ser introduzido no meio após a sua adição aos recipientes de ensaio. Neste caso, devem tomar-se precauções a fim de assegurar que o produto químico em estudo é distribuído de forma homogénea no sistema de ensaio sem perturbar o sedimento.
51. Em todos os casos, o aspeto (por exemplo, límpido, turvo, etc.) do meio é registado no início do ensaio.

Exposição através do sedimento

52. O enriquecimento dos novos sedimentos na concentração escolhida é efetuado por adição direta de uma solução do produto químico 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 de reserva do produto químico em estudo, dissolvida em água desionizada. Se o produto químico for pouco solúvel em água, pode ser dissolvido num volume tão baixo quanto possível de um solvente orgânico adequado (por exemplo, hexano, acetona ou clorofórmio). Seguidamente, esta solução é misturada com cerca de 10 g de areia quartzítica fina por recipiente de ensaio. Deixa-se que o solvente se evapore e mistura-se a areia com a quantidade adequada de sedimento por copo de ensaio. Para solubilizar, dispersar ou emulsionar o produto químico em estudo apenas podem utilizar-se agentes de fácil volatilização. O volume/peso da areia enriquecida com o produto químico em estudo tem de ser tido em conta na preparação final do sedimento (o sedimento deve, pois, ser preparado com menos areia). Deve ter-se o cuidado de assegurar a distribuição total e uniforme do produto químico no sedimento.
53. Enchem-se os vasos com o sedimento enriquecido, como atrás descrito. As plantas, selecionadas com base na uniformidade e num sistema radicular adequado, são removidas dos vasos utilizados durante a fase de estabelecimento e transplantadas para o sedimento enriquecido como descrito acima.
54. Os vasos são colocados nos recipientes de ensaio, tal como exigido pela conceção experimental. Em seguida, adiciona-se cuidadosamente, com um funil, o meio de Smart e Barko, para evitar a perturbação do sedimento. Mede-se o comprimento do rebento acima do sedimento, quer antes ou depois da introdução do meio.

Manutenção dos níveis de água ao longo da duração do ensaio

55. O volume de água final deve ser registado e o nível de água assinalado em cada recipiente de ensaio. Caso mais de 10 % da água se evapore durante o ensaio, o nível de água deve ser ajustado com água destilada. Se necessário, os copos podem ser tapados, mas não vedados, com uma cobertura transparente — como tampas de plástico —, para minimizar a evaporação e a contaminação por esporos de algas.

Condições de ensaio

56. Utiliza-se iluminação fluorescente com luz branca, quente e/ou fria, para proporcionar uma radiação luminosa na gama de aproximadamente $140 (\pm 20) \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ medida num comprimento de onda de fotossíntese (400-700 nm) à superfície da água, utilizando um ciclo de 16 horas de luz seguidas de 8 horas de escuridão. Quaisquer diferenças em relação à radiação luminosa selecionada na zona de ensaio não devem exceder o intervalo de $\pm 15 \%$.

57. A temperatura dos recipientes de ensaio é 20 ± 2 °C.
58. O pH do meio de controlo não deve aumentar mais de 1,5 unidades durante o ensaio. No entanto, um desvio superior a 1,5 unidades de pH não invalidará o ensaio quando se possa demonstrar que os critérios de validade previamente especificados são cumpridos.

Duração do ensaio

59. O período de exposição é de 14 dias.

Medições e determinações analíticas

60. Após a fase de estabelecimento e imediatamente antes do tratamento (ou seja, no dia 0), as plantas de reserva de cinco vasos selecionados aleatoriamente para o ensaio com três plantas por vaso ou 15 vasos para o ensaio com uma planta por vaso são colhidas para avaliação do comprimento do rebento, bem como do peso fresco e seco, como descrito abaixo.
61. No que diz respeito às plantas transferidas para a fase de exposição, são efetuadas as seguintes avaliações conforme demonstrado no quadro 1:
- Registam-se as medições do comprimento do rebento principal, o número de rebentos laterais e o comprimento dos rebentos laterais pelo menos no final do período de exposição (por exemplo, no dia 14).
 - Registam-se as avaliações visuais da saúde da planta pelo menos três vezes durante o período de exposição (por exemplo, nos dias 0, 7 e 14).
 - Efetuam-se medições do peso fresco e seco dos rebentos no final do ensaio (ou seja, no dia 14).
62. O comprimento dos rebentos é determinado com uma régua. Caso existam rebentos laterais, também devem registar-se os seus números e o respetivo comprimento.
63. As avaliações visuais da saúde das plantas são efetuadas através do registo do aspeto das plantas e da condição geral do meio de ensaio. As observações a registar incluem o seguinte:
- necrose, clorose ou outra descoloração como vermelhidão excessiva em relação às plantas de controlo;
 - contaminação por bactérias ou algas;
 - anomalias de crescimento, como crescimento incompleto, alterações na distância entre os nós, folhas/rebentos distorcidos, proliferação de rebentos laterais, perda de folhas, perda de turgescência e fragmentação do caule;
 - as avaliações visuais da saúde das raízes são efetuadas no final do ensaio, após uma lavagem cuidadosa para retirar o sedimento das raízes a fim de permitir a observação do sistema radicular. Apresenta-se em seguida uma proposta de escala para a avaliação, por comparação com as plantas de controlo:
- 1) ausência de raízes
 - 2) poucas raízes
 - 3) desenvolvimento moderado da raiz
 - 4) desenvolvimento muito bom da raiz, semelhante aos controlos
64. As determinações do peso fresco são efetuadas no início e no final do ensaio através do corte do rebento ao nível do sedimento e da subsequente secagem com papel antes da pesagem. Devem tomar-se precauções para remover as partículas de sedimento suscetíveis de aderir à base do rebento. Em seguida, o material do rebento é colocado numa estufa de secagem a cerca de 60 °C para secagem até um peso constante, antes da nova pesagem e do registo do peso seco.
65. O quadro 1 apresenta um resumo das avaliações biológicas mínimas exigidas ao longo da duração do ensaio.

Quadro 1

Calendário de avaliação

Dia após tratamento (DAT)	<i>Myriophyllum spicatum</i>			
	Comprimento do rebento, comprimento e número dos rebentos laterais	Avaliação visual dos rebentos	Peso fresco e seco dos rebentos, Avaliação visual das raízes	pH O ₂
0	A	A	A	A
4	—	—	-	—
7	—	A	-	A
14	A	A	A	A

A: indica que são necessárias avaliações nestas ocasiões

—: indica que não são necessárias medições

Frequência das medições e determinações analíticas

66. Deve registar-se diariamente a temperatura do meio contido num frasco suplementar mantido nas mesmas condições na câmara de crescimento, incubadora ou sala utilizada para o ensaio (ou continuamente com um registador de dados).
67. O pH e a concentração do oxigénio dissolvido do meio de ensaio devem ser verificados no início do mesmo, pelo menos uma vez durante o estudo e no final deste, em todos os replicados. Em cada ocasião, as medições devem ser efetuadas na mesma altura do dia. Caso se utilizem soluções a granel para preparar todos os replicados em cada concentração de ensaio, é aceitável uma única medição de cada solução a granel no dia 0.
68. Deve medir-se a irradiância na câmara de crescimento, na incubadora ou na sala, em pontos equivalentes ao nível da superfície da água. As medições deverão ser efetuadas pelo menos uma vez no início do ensaio ou durante o mesmo. O método de deteção e medição da luz e, em particular, o tipo de sensor utilizado, afetarão o valor medido. Os sensores esféricos (que reagem à luz proveniente de todos os ângulos acima e abaixo do plano de medição) e os sensores «de cosseno» (que respondem à luz proveniente de todos os ângulos acima do plano de medição) são preferíveis aos sensores unidirecionais e fornecem leituras mais elevadas para as fontes múltiplas de luz do tipo aqui descrito.

Determinações analíticas do produto químico em estudo

69. A aplicação correta do produto químico em estudo deve ser fundamentada por determinações analíticas das concentrações do produto químico em estudo.
70. Devem ser colhidas amostras de água para análise química pouco depois do início do ensaio (ou seja, no dia de aplicação, para produtos químicos em estudo estáveis, ou uma hora após a aplicação, para produtos químicos que não sejam estáveis), bem como no final do mesmo, para todas as concentrações de ensaio.
71. As concentrações no sedimento e nas águas capilares deste devem ser determinadas no início do ensaio e no final do mesmo, pelo menos na concentração de ensaio mais elevada, a menos que se saiba que os produtos químicos em estudo são estáveis em água (> 80 % da concentração nominal). Pode não ser necessário efetuar medições nos sedimentos e nas águas capilares, caso a partição do produto químico em estudo entre a água e os sedimentos tenha sido claramente determinada num estudo água/sedimento em condições comparáveis (por exemplo, coeficiente de partição sedimento/água, método de aplicação, tipo de sedimento).

72. A amostragem do sedimento no início do ensaio é passível de perturbar o sistema. Assim, pode ser necessário um número adicional de recipientes de ensaio tratados a fim de facilitar as determinações analíticas no início e no final do ensaio. Do mesmo modo, sempre que se considere necessária a realização de avaliações intermédias — ou seja, no dia 7 — e as análises exijam grandes amostras de sedimento impossíveis de remover facilmente do sistema de ensaio, as determinações analíticas devem ser executadas com recipientes de ensaio adicionais tratados da mesma forma que os utilizados para as avaliações biológicas.
73. Recomenda-se a centrifugação, por exemplo, a 10 000 g e 4 °C durante 30 minutos, com vista a isolar a água intersticial. No entanto, a filtração também é aceitável, se se demonstrar que o produto químico em estudo não é absorvido pelos filtros. Em alguns casos, se a amostra for demasiado pequena, poderá não ser possível analisar as concentrações da água capilar.
74. Nos ensaios semiestáticos (ou seja, exposição através da fase aquosa) em que não se preveja que a concentração do produto ou produtos químicos relevantes permaneça no intervalo de 20 % da concentração nominal ao longo da duração do ensaio sem renovação das soluções de ensaio, devem recolher-se amostras das soluções usadas e preparadas de fresco para análises da concentração do produto químico em estudo em cada renovação.
75. Nos casos em que a concentração inicial medida do produto químico em estudo não se encontre no intervalo de 20 % do valor nominal, mas em que se possam fornecer provas suficientes de que as concentrações iniciais são reprodutíveis e estáveis (isto é, se mantêm dentro da gama 80-120 % das concentrações iniciais), as determinações químicas podem ser limitadas às concentrações maior e menor usadas no ensaio.
76. Em todos os casos, a determinação das concentrações do produto químico em estudo só precisa de ser efetuada no recipiente de um dos replicados, para cada concentração de ensaio. Em alternativa, as soluções de ensaio de todos os replicados para cada concentração podem ser agrupadas para análise.
77. Se existirem provas de que a concentração do produto químico em estudo não variou mais de 20 % ao longo do ensaio relativamente ao valor da concentração nominal ou da concentração inicial medida, a análise dos resultados e a subsequente obtenção de pontos finais podem basear-se nos valores nominais ou iniciais medidos.
78. Nestes casos, as concentrações com efeitos devem basear-se em concentrações nominais ou medidas na água no início do ensaio.
79. Todavia, caso existam indícios de que a concentração diminuiu ao longo do ensaio — ou seja, não se manteve no intervalo de 20 % da concentração nominal ou inicial medida no compartimento tratado —, a análise dos resultados deve basear-se na média geométrica da concentração durante a exposição ou em modelos que descrevam a diminuição da concentração do produto químico em estudo no compartimento tratado (11).

AValiação dos dados

80. Nos casos em que seja necessária a utilização de um solvente/dispersante, os dados dos controlos sem tratamento e com o solvente podem ser agrupados para efeitos de análise estatística, desde que as respostas dos controlos sem tratamento e com o solvente não sejam significativamente diferentes em termos estatísticos.

Variáveis de resposta

81. O objetivo do ensaio consiste em determinar os efeitos do produto químico em estudo no crescimento vegetativo da espécie de ensaio, mediante a utilização de duas variáveis de resposta, a taxa média de crescimento específico e o rendimento, do seguinte modo:

Taxa média de crescimento específico

82. Esta variável de resposta baseia-se em alterações nos logaritmos do comprimento total do rebento, no peso fresco total do rebento e no peso seco total do rebento, ao longo do tempo, nos controlos e em cada grupo de exposição. É calculada para cada um dos replicados de cada grupo de controlo e de exposição. O peso e o comprimento médios das três plantas por recipiente de ensaio (replicado) e, subsequentemente, a taxa de crescimento para cada replicado, são calculados pela seguinte fórmula:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

em que:

μ_{i-j} : taxa média de crescimento específico entre o momento i e o momento j

N_i : variável de medição no recipiente de ensaio ou de controlo no momento i

N_j : variável de medição no recipiente de ensaio ou de controlo no momento j

t: período decorrido entre i e j

83. A partir dos valores dos replicados, calcula-se um valor médio da taxa de crescimento, associado às respetivas estimativas da variância para cada um dos grupos de exposição e de controlo.
84. Calcula-se a taxa média de crescimento específico para a totalidade do período de ensaio (na fórmula acima, «i» é o momento inicial e «j» o momento final do ensaio). Para cada uma das concentrações de ensaio e de controlo, calcular o valor médio da taxa média de crescimento específico, associado às respetivas estimativas da variância.
85. A percentagem de inibição da taxa de crescimento (I_r) pode então ser calculada para cada concentração de ensaio (grupos expostos), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

em que:

% I_r : inibição percentual da taxa média de crescimento específico

μ_c : valor médio de μ no controlo

μ_T : valor médio de μ no grupo de tratamento

Rendimento

86. Esta variável de resposta baseia-se em alterações ao longo do tempo no comprimento total, no peso fresco total e no peso seco total do rebento, nos controlos e em cada grupo exposto. Para cada grupo exposto, a percentagem média de inibição do rendimento (% I_y) é calculada do seguinte modo:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

em que:

% I_y : redução percentual do rendimento

b_c : biomassa final menos biomassa inicial do grupo de controlo

b_T : biomassa final menos biomassa inicial do grupo exposto

Representação gráfica das curvas concentração-resposta

87. Devem representar-se as curvas de concentração-resposta, que relacionam a percentagem média de inibição da variável de resposta (I_r ou I_y), calculadas como se indica acima, com o logaritmo da concentração do produto químico em estudo.

Estimativa da EC_x

88. As estimativas da EC_x (p. ex.: EC_{50}) devem basear-se tanto na taxa média de crescimento específico (E_rC_x) como no rendimento (E_yC_x), devendo cada uma dessas medidas, por seu turno, basear-se no peso fresco total, no peso seco total e no comprimento total do rebento.
89. Cabe aqui notar que os valores de EC_x calculados através destas duas variáveis de resposta não são comparáveis e que a diferença entre esses valores é reconhecida para efeitos da utilização dos resultados do ensaio. Os valores de EC_x baseados na taxa média de crescimento específico (E_rC_x) são, na maioria dos casos, mais elevados do que os resultados baseados no rendimento (E_yC_x) — se forem seguidas as condições de ensaio apresentadas no presente método de ensaio — devido à base matemática das respetivas abordagens. Esta diferença não deve ser interpretada como uma diferença de sensibilidade entre as duas variáveis de resposta, mas simplesmente como uma diferença matemática entre os valores.

Procedimentos estatísticos

90. O objetivo consiste em descrever a relação concentração-resposta de forma quantitativa, por análise de regressão. Pode utilizar-se uma regressão linear ponderada, antecedida de uma transformação de linearização dos dados de resposta, p. ex., para unidades probit, logit ou de Weibull (13), mas a técnica preferida é o recurso a procedimentos de regressão não linear, que permitem lidar melhor com as inevitáveis irregularidades dos dados e com os desvios relativamente a uma boa distribuição. Nas zonas próximas da inibição nula ou total, essas irregularidades podem ser aumentadas pela transformação, o que irá interferir com a análise (13). Cabe aqui notar que os métodos padrão de análise que utilizam os transformados probit, logit ou de Weibull se destinam à análise de dados quantais (por exemplo, mortalidade ou sobrevivência), pelo que terão de ser alterados para lidar com os dados relativos à taxa de crescimento ou ao rendimento. Alguns métodos para a determinação dos valores de EC_x a partir de dados contínuos podem ser consultados em (14), (15), (16) e (17).
91. Para cada uma das variáveis de resposta em análise, utilizar a relação concentração-resposta para estimar os valores pontuais de EC_x . São determinados os intervalos de confiança de 95 % para cada estimativa, devendo avaliar-se a adequação do ajustamento da curva pelo modelo de regressão aos dados de resposta, graficamente ou por métodos estatísticos. A análise por regressão deve utilizar os valores de cada replicado e não o valor médio para cada grupo exposto.
92. As estimativas da EC_{50} e os respetivos intervalos de confiança podem também ser obtidos utilizando uma interpolação linear com *bootstrapping* (18), quando os modelos/métodos de regressão disponíveis não forem aplicáveis aos dados existentes.
93. Para a estimativa da LOEC e, portanto, da NOEC, será necessário comparar as médias dos recipientes expostos, utilizando técnicas de análise da variância (ANOVA). A média para cada concentração é então comparada com a média observada nos controlos, utilizando um método adequado (p. ex., os testes de Dunnett ou de Williams) (19) (20) (21) (22). É necessário verificar o cumprimento do pressuposto de distribuição normal (ND) e homogeneidade da variância (VH) das análises ANOVA. Esta avaliação deve ser realizada por recurso ao teste de Shapiro-Wilks (ND) ou ao teste de Levene (VH). O incumprimento do pressuposto de distribuição normal e homogeneidade das variâncias pode por vezes ser corrigido através da transformação logarítmica dos dados. Caso a heterogeneidade da variância e/ou o desvio da distribuição normal sejam extremos e não possam ser corrigidos por transformação, deve ponderar-se a análise com recurso a métodos como o teste t de Bonferroni-Welch, o método degressivo de Jonkheere-Terpstra e o teste de comparação de médias de Bonferroni. Para mais orientações sobre a determinação da NOEC, consultar a referência (16).

RELATÓRIOS

94. O relatório do ensaio inclui os seguintes dados:

Produto químico em estudo

Substância monocomponentes:

— aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas relevantes;

- dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química de impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

- caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Espécie de ensaio

- nome científico e fonte.

Condições de ensaio

- duração e condições da fase de estabelecimento;
- procedimento de ensaio utilizado (estático, semiestático, pulsado);
- data de início do ensaio e respetiva duração;
- meio de ensaio, ou seja, sedimento e meio nutriente líquido;
- descrição do método experimental: sala/câmara de crescimento ou laboratório, recipientes de ensaio e tampas, volumes da solução, comprimento e peso das plantas de ensaio por recipiente de ensaio no início do ensaio, rácio da superfície do sedimento para a superfície de água, rácio do volume do sedimento e da água;
- concentrações de ensaio (nominais ou medidas, conforme apropriado) e número de replicados por concentração;
- métodos de preparação das soluções de reserva e de ensaio, incluindo a eventual utilização de solventes ou dispersantes;
- temperatura durante o ensaio;
- fonte luminosa, irradiância ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$);
- os valores pH dos meios de controlo e de ensaio, bem como o aspeto dos meios de ensaio no início e no final do ensaio;
- concentrações de oxigénio;
- o método de análise, juntamente com os dados adequados à avaliação da qualidade do método (estudos de validação, desvios-padrão ou intervalos de confiança das análises);
- métodos de determinação de variáveis de medição, p. ex., comprimento, peso seco, peso fresco;
- todos os desvios em relação ao presente método de ensaio.

Resultados

- dados brutos: comprimento dos rebentos e peso dos rebentos das plantas/dos vasos e outras variáveis de medição em cada recipiente de controlo e de ensaio em cada observação e momento de realização de análises de acordo com o calendário de avaliação apresentado no quadro 1;
- médias e desvios-padrão para cada variável de medição;
- curvas de crescimento para cada concentração;
- tempo de duplicação/taxa de crescimento no controlo com base no comprimento e no peso fresco do rebento incluindo o coeficiente de variação de rendimento do peso fresco;
- variáveis de resposta calculadas para cada replicado exposto, com os respetivos valores médios, e coeficiente de variação dos replicados;
- representação gráfica da relação concentração/efeito;
- estimativas dos pontos finais de toxicidade para as variáveis de resposta, p. ex. EC_{50} , e os intervalos de confiança associados. Se forem calculados, valores da LOEC e/ou da NOEC e métodos estatísticos utilizados para a respetiva determinação;

- Caso tenha sido efetuada uma análise ANOVA, dimensão do efeito detetado (por exemplo, diferença significativa mínima).
- ocorrência de estimulação do crescimento que tenha sido verificada em qualquer dos grupos expostos;
- sinais visuais de fitotoxicidade, bem como quaisquer observações em relação às soluções de ensaio;
- discussão dos resultados, incluindo qualquer influência nos resultados do ensaio decorrente de alterações do presente método de ensaio.

REFERÊNCIAS

- (1) Capítulo C.26 do presente anexo: *Ensaio de inibição de crescimento com Lemna sp.*
- (2) Capítulo C.3 do presente anexo: Algas e cianobactérias de água doce — Ensaio de inibição do crescimento.
- (3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 janeiro de 2008.
- (4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 199-206.
- (5) ISO 16191:2013 Water quality — Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of *Myriophyllum aquaticum*.
- (6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, pp. 715-722.
- (7) Capítulo C.50 do presente anexo: Ensaio de toxicidade em *Myriophyllum spicatum* sem sedimentos.
- (8) Capítulo C.28 do presente anexo: Ensaio de toxicidade em quironomídeos num sistema sedimento-água com água enriquecida.
- (9) Ratte, M., H. Ratte (2014), «*Myriophyllum* Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, n.º 206, OECD Publishing, Paris.
- (10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron — a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 231-237.
- (11) OCDE (2000), «Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, n.º 23, OECD Publishing, Paris.
- (12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251-263.
- (13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718.
- (14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157-167.
- (15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.
- (16) OCDE (2006), «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, n.º 54, OECD Publishing, Paris.
- (17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp. 93-96.

-
- (18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
 - (19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
 - (20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, pp. 482-491.
 - (21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, pp. 103-117.
 - (22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, pp. 519-531.
-

Apêndice 1

COMPOSIÇÃO DO MEIO DE SMART E BARKO

Componente	Quantidade de reagente adicionada à água (*) (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	91,7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	69,0
NaHCO_3	58,4
KHCO_3	15,4
pH (em equilíbrio com o ar)	7,9
(*) água desmineralizada (destilada ou desionizada)	

Apêndice 2

DEFINIÇÕES

Biomassa: peso fresco e/ou seco da matéria viva presente numa população. No presente ensaio, a biomassa é constituída pela soma do rebento principal, de todos os ramos laterais e de todas as raízes.

Produto químico: uma substância ou mistura.

Clorose: a alteração de cor de verde para o amarelecimento do organismo de ensaio, em especial dos verticilos.

Ec_x: concentração do produto químico em estudo dissolvido no meio de ensaio que resulta numa redução de x % (por exemplo, 50 %) no crescimento de *Myriophyllum spicatum* num determinado período de exposição (que deverá ser explicitamente mencionado nos casos em que se afaste da duração total ou normal do ensaio). A fim de indicar de forma inequívoca se o valor de EC se refere à taxa de crescimento ou ao rendimento, o símbolo «E_rC» é utilizado no primeiro caso e o símbolo «E_cC» no segundo, sendo seguidos da designação da variável de medição utilizada, por exemplo, E_rC (comprimento do rebento principal).

Crescimento: aumento da variável de medição, por exemplo, comprimento do rebento principal, comprimento total dos ramos laterais, comprimento total do rebento, comprimento total da raiz, peso fresco, peso seco ou número de verticilos, no período de ensaio.

Taxa de crescimento (taxa média de crescimento específico): aumento logarítmico da variável de medição durante o período de exposição. *Nota:* As variáveis de resposta relacionadas com a taxa de crescimento são independentes da duração do ensaio desde que o padrão de crescimento dos organismos de controlo não expostos seja exponencial.

Menor concentração com efeito observável (LOEC): concentração mais baixa à qual se observa que o produto químico em estudo tem um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de redução do crescimento, quando comparada com o controlo, para um determinado período de exposição. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior ao verificado com a LOEC. Quando estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deverá ser fornecida uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, consequentemente, a NOEC).

Variáveis de medição: qualquer tipo de variável que seja medida para permitir a determinação do ponto final do ensaio, utilizando uma ou mais variáveis de resposta. No presente método de ensaio, o comprimento do rebento principal, o comprimento total dos ramos laterais; o comprimento total do rebento, o comprimento total da raiz, o peso fresco, o peso seco e o número de verticilos são variáveis de medição.

Monocultura: cultura com uma única espécie de planta.

Necrose: tecido morto (ou seja, branco ou castanho escuro) do organismo de ensaio.

Concentração sem efeitos observáveis (NOEC): a concentração de ensaio imediatamente inferior à LOEC.

Variável de resposta: uma variável de estimativa da toxicidade, derivada de qualquer das variáveis medidas que descrevem a biomassa nos diferentes métodos de cálculo. No presente método de ensaio, a taxa de crescimento e o rendimento são variáveis de resposta derivadas de variáveis de medição como o comprimento do rebento principal, o comprimento total do rebento, o peso fresco, o peso seco ou o número de verticilos.

Ensaio semiestático (com renovação): ensaio em que a solução de ensaio é periodicamente substituída, em momentos específicos do ensaio.

Ensaio estático: ensaio durante o qual não há renovação da solução de ensaio.

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

Ponto final do ensaio: descreve, em termos gerais, o fator que será alterado pelo produto químico em estudo, por comparação com o controlo, e cuja identificação é o objetivo do ensaio. No presente método, o ponto final é a inibição do crescimento, que pode ser expressa por diferentes variáveis de resposta, baseadas em uma ou mais variáveis de medição.

Meio de ensaio: meio sintético completo de crescimento em que as plantas de ensaio são cultivadas quando expostas ao produto químico em estudo. Em geral, o produto químico em estudo é dissolvido no meio de ensaio.

UVCB: uma substância de composição desconhecida ou variável, produto de reação complexo ou material biológico.

Rendimento: valor de uma variável de medição que exprime a diferença entre a biomassa no final do período de exposição e o valor dessa variável de medição no início do período de exposição. Nota: Quando o padrão de crescimento dos organismos não expostos é exponencial, as variáveis de resposta com base no rendimento diminuirão ao longo do ensaio.
