

Decreto-Lei n.º 222/2001
de 8 de Agosto

Com a publicação do Decreto-Lei n.º 82/95, de 22 de Abril, foram aprovados os princípios gerais do regime jurídico da notificação de substâncias químicas e da classificação, embalagem e rotulagem de substâncias perigosas para a saúde humana ou para o ambiente.

A Portaria n.º 732-A/96, de 11 de Dezembro, veio regulamentar o citado Decreto-Lei n.º 82/95, tendo aprovado o Regulamento para a Notificação de Substâncias Químicas e para a Classificação, Embalagem e Rotulagem de Substâncias Perigosas, completando, assim, o processo de transposição para a ordem interna das directivas aplicáveis neste domínio.

A referida portaria foi, depois, alterada pelo Decreto-Lei n.º 330-A/98, de 2 de Novembro, pelo Decreto-Lei n.º 209/99, de 11 de Junho, e pelo Decreto-Lei n.º 195-A/2000, de 22 de Agosto, em virtude de novas exigências de adaptação ao progresso científico e técnico determinadas pela necessidade de transposição de novo normativo comunitário entretanto publicado.

A este propósito refira-se que para a nossa ordem jurídica foram transpostas para o direito interno todas as directivas comunitárias decorrentes da Directiva n.º 67/548/CEE, do Conselho, até à 25.ª adaptação ao progresso técnico e à 8.ª emenda à referida directiva.

Como facilmente se constata, a legislação comunitária nesta temática é alvo permanente de sucessivas alterações, adoptadas à luz do progresso dos conhecimentos científicos e técnicos adquiridos, que a legislação interna tem de acompanhar.

É, também, este o fundamento da publicação do presente diploma, em virtude da recente Directiva n.º 2000/21/CE, de 25 de Abril, que introduz uma isenção de notificação para os produtos fitofarmacêuticos e biocidas, e das Directivas n.os 2000/32/CE, de 19 de Maio, e 2000/33/CE, de 25 de Abril, ambas da Comissão, que adoptam alterações aos anexos técnicos.

Acresce que a Decisão da Comissão n.º 2000/368/CE, de 19 de Maio, corrigiu a Directiva n.º 98/98/CE, a qual adaptava ao progresso técnico, pela 25.ª vez, a Directiva n.º 67/548/CEE e que fora transposta para o direito interno pelo Decreto-Lei n.º 195-A/2000, de 22 de Agosto. Importa igualmente implementar na ordem jurídica interna estas alterações.

O presente diploma procede à transposição das Directivas n.os 2000/21/CE, 2000/32/CE e 2000/33/CE, da Comissão, de 25 de Abril, 19 de Maio e 25 de Abril, respectivamente, bem como à aplicação da Decisão da Comissão n.º 2000/368/CE, de 19 de Maio.

Assim:

Nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 198.º da Constituição, o Governo decreta o seguinte:

Artigo 1.º

Objecto

O presente diploma tem por objecto a alteração do Regulamento para a Notificação de Substâncias Químicas e para a Classificação, Embalagem e Rotulagem de Substâncias Perigosas, aprovado pela Portaria n.º 732-A/96, de 11 de Dezembro, com a redacção dada pelo Decreto-Lei n.º 330-A/98, de 2 de Novembro, pelo Decreto-Lei n.º 209/99, de 11 de Junho, e pelo Decreto-Lei n.º 195-A/2000, de 22 de Agosto, transpondo para a ordem jurídica interna a Directiva n.º 2000/21/CE, da Comissão, de 25 de Abril, que introduz uma isenção de notificação para os produtos fitofarmacêuticos e biocidas, e as Directivas n.os 2000/32/CE e 2000/33/CE, ambas da Comissão, de 19 de Maio e 25 de Abril, respectivamente, que alteram e adaptam ao progresso técnico, pela 26.ª e 27.ª vez, a Directiva n.º 67/548/CEE, do Conselho, de 27 de Julho, e aplicando a Decisão da Comissão n.º 2000/368/CE, de 19 de Maio, que corrige o anexo VI do referido Regulamento.

Artigo 2.º

Alteração ao artigo 16.º do Regulamento para a Notificação de Substâncias Químicas e para a Classificação, Embalagem e Rotulagem de Substâncias Perigosas.

O n.º 1 do artigo 16.º do Regulamento para a Notificação de Substâncias Químicas e para a Classificação, Embalagem e Rotulagem de Substâncias Perigosas, aprovado pela Portaria n.º 732-A/96, de 11 de Dezembro, com as alterações introduzidas pelo Decreto-Lei n.º 330-A/98, de 2 de Novembro, pelo Decreto-Lei n.º 209/99, de 11 de Junho, e pelo Decreto-Lei n.º 195-A/2000, de 22 de Agosto, é alterado nos termos seguintes:

«Artigo 16.º

[...]

1 - ...

a) ...

b) ...

c) ...

d) As que sejam usadas exclusivamente como substâncias activas de produtos fitofarmacêuticos;

e) As que sejam usadas exclusivamente como substâncias activas de produtos biocidas;

f) [Corresponde à anterior alínea d).]»

Artigo 3.º

Alterações ao anexo I do Regulamento para a Notificação de Substâncias Químicas e para a Classificação, Embalagem e Rotulagem de Substâncias Perigosas.

O anexo I do Regulamento para a Notificação de Substâncias Químicas e para a Classificação, Embalagem e Rotulagem de Substâncias Perigosas é alterado nos termos seguintes:

a) As entradas dos elementos químicos constantes da tabela A do anexo I são substituídas pelas correspondentes entradas do anexo I ao presente diploma, do qual faz parte integrante;

b) As entradas constantes do anexo I são substituídas pelas correspondentes entradas do anexo II ao presente diploma, do qual faz parte integrante;

c) São aditadas, pela primeira vez, as entradas que figuram no anexo III ao presente diploma, do qual faz parte integrante.

Artigo 4.º

Alterações ao anexo V do Regulamento para a Notificação de Substâncias Químicas e para a Classificação, Embalagem e Rotulagem de Substâncias Perigosas.

1 - A parte B do anexo V do Regulamento para a Notificação de Substâncias Químicas e para a Classificação, Embalagem e Rotulagem de Substâncias Perigosas é alterada da seguinte forma:

a) O texto do capítulo B.10 é substituído pelo texto constante do anexo IV ao presente diploma, do qual faz parte integrante;

b) O texto do capítulo B.11 é substituído pelo texto constante do anexo V ao presente diploma, do qual faz parte integrante;

c) O texto do capítulo B.12 é substituído pelo texto constante do anexo VI ao presente diploma, do qual faz parte integrante;

d) O texto dos capítulos B.13 e B.14 é substituído pelo texto constante do anexo VII ao presente diploma, do qual faz parte integrante;

e) O texto do capítulo B.17 é substituído pelo texto constante do anexo VIII ao presente diploma, do qual faz parte integrante;

f) O texto do capítulo B.23 é substituído pelo texto constante do anexo IX ao presente diploma, do qual faz parte integrante;

g) É aditado o capítulo B.39 constante do anexo X ao presente diploma, do qual faz parte integrante;

h) É aditado o capítulo B.40 constante do anexo XI ao presente diploma, do qual faz parte integrante;

i) É aditado o capítulo B.41 constante do anexo XII ao presente diploma, do qual faz parte integrante.

2 - É eliminado o quarto travessão na introdução geral à parte C do anexo V do Regulamento para a Notificação de Substâncias Químicas e para a Classificação, Embalagem e Rotulagem de Substâncias Perigosas.

Artigo 5.º

Alterações ao anexo VI do Regulamento para a Notificação de Substâncias Químicas e para a Classificação, Embalagem e Rotulagem de Substâncias Perigosas.

O anexo VI do Regulamento para a Notificação de Substâncias Químicas e para a Classificação, Embalagem e Rotulagem de Substâncias Perigosas é o constante do anexo XIII ao presente diploma, do qual faz parte integrante.

Artigo 6.º

Alterações ao anexo IX do Regulamento para a Notificação de Substâncias Químicas e para a Classificação, Embalagem e Rotulagem de Substâncias Perigosas.

O anexo IX do Regulamento para a Notificação de Substâncias Químicas e para a Classificação, Embalagem e Rotulagem de Substâncias Perigosas é alterado em conformidade com o anexo XIV ao presente diploma, do qual faz parte integrante.

Visto e aprovado em Conselho de Ministros de 17 de Maio de 2001. - António Manuel de Oliveira Guterres - Mário Cristina de Sousa - Maria Manuela de Brito Arcanjo Marques da Costa - José Sócrates Carvalho Pinto de Sousa.

Promulgado em 28 de Junho de 2001.

Publique-se.

O Presidente da República, JORGE SAMPAIO.

Referendado em 5 de Julho de 2001.

O Primeiro-Ministro, António Manuel de Oliveira Guterres.

ANEXO I

(ver quadro no documento original)

ANEXO II

(ver quadro no documento original)

ANEXO III

(ver quadro no documento original)

ANEXO IV

B.10 Mutagenicidade - Ensaio in vitro de aberrações cromossómicas em mamíferos

1 Método

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 473 - Ensaio in vitro de aberrações cromossómicas em mamíferos (1997).

1.1 Introdução

O objectivo do ensaio in vitro de aberrações cromossómicas é identificar os agentes que causam aberrações estruturais dos cromossomas em culturas de células de mamíferos (ver nota 1) (ver nota 2) (ver nota 3). As aberrações estruturais podem ser de dois tipos, afectando os cromossomas ou os cromatídeos. A maior parte dos mutagénicos químicos induzem aberrações cromatídicas, mas também podem ocorrer aberrações cromossómicas. Um aumento da taxa de poliploidia pode indicar que um determinado produto químico tem potencial para induzir aberrações numéricas. Contudo, este método não foi concebido para

medir as aberrações numéricas nem é normalmente utilizado com esse objectivo. As mutações nos cromossomas e eventos relacionados causam diversas doenças genéticas humanas, existindo provas substanciais de que as alterações que causam nos oncogenes e nos genes supressores de tumores das células somáticas estão envolvidas na indução de cancro nos seres humanos e em animais utilizados em experiências.

O ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas pode envolver culturas de linhas celulares bem estabelecidas, de uma determinada estirpe ou ainda culturas de células primárias. As células utilizadas são seleccionadas com base na sua capacidade de crescimento em cultura, na estabilidade do cariótipo, no número e diversidade dos seus cromossomas e na frequência das aberrações cromossómicas espontâneas.

Os ensaios *in vitro* exigem geralmente a utilização de uma fonte exógena de activação metabólica, que não consegue imitar inteiramente as condições *in vivo* nos mamíferos. Deve ter-se o cuidado de evitar condições que conduzam a resultados positivos que não sejam reflexo de uma mutagenicidade intrínseca mas que possam resultar, por exemplo, de mudanças do pH, da pressão osmótica ou ainda de níveis elevados de citotoxicidade (ver nota 4) (ver nota 5).

O presente ensaio é utilizado para a análise de agentes eventualmente mutagénicos ou carcinogénicos para os mamíferos. Muitos dos compostos que dão um resultado positivo no presente ensaio são carcinogénicos nos mamíferos, não existindo, contudo, uma correlação perfeita entre o ensaio e a carcinogenicidade. A correlação depende da classe química e existem cada vez mais provas de que alguns agentes carcinogénicos não são detectados por este ensaio, por os seus mecanismos de actuação não passarem directamente pela danificação do ADN.

V., também, a parte B da introdução geral.

1.2 Definições

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

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

Endoreduplicação: 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, ... cromátídeos.

Lacuna: lesão acromática de extensão inferior à largura de um cromátídeo e que determine um ligeiro desalinhamento do mesmo.

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

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

Poliploidia: número de cromossomas múltiplo do número haplóide (n), mas diferente do número diplóide (ou seja, $3n$, $4n$, etc.).

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

1.3 Princípio do método de ensaio

As culturas celulares são expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica. Após um período determinado, adiciona-se um produto fixador da metafase (por exemplo Colcemid(marca registada) ou colchicina); as células são colhidas, coradas e analisadas microscopicamente para detectar a presença de aberrações cromossómicas nas células em metafase.

1.4 Descrição do método de ensaio

1.4.1 Preparação

1.4.1.1 Células

Podem utilizar-se diversas linhas celulares, estirpes ou culturas celulares primárias, incluindo células humanas (por exemplo: fibroblastos do hamster da China ou linfócitos da circulação periférica do ser humano ou de outros mamíferos).

1.4.1.2 Meios e condições de cultura

As culturas devem ser mantidas em meios de cultura e condições de incubação adequados (tipo de recipiente, concentração de CO₂ (índice 2), temperatura e humidade). As linhas celulares e estirpes devem ser periodicamente controladas no que respeita à estabilidade do número modal de cromossomas e à ausência de contaminação por micoplasma, não devendo ser utilizadas se se verificar que foram contaminadas. Deve ser conhecida a duração do ciclo celular normal para as células e condições de cultura utilizadas.

1.4.1.3 Preparação das culturas

Linhas e estirpes de células definidas: multiplicam-se as células provenientes de culturas de arranque por incubação a 37°C num meio cuja densidade não permita a confluência das culturas antes da colheita.

Linfócitos: adiciona-se sangue total tratado com anticoagulante (por exemplo: heparina) ou linfócitos provenientes de indivíduos saudáveis a um meio de cultura contendo um agente mitogénico (por exemplo: fito-hemaglutinina), incubando a 37°C.

1.4.1.4 Activação metabólica

As células devem ser expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema adequado de activação metabólica. O sistema mais frequentemente utilizado consiste numa fracção pós-mitocondrial reforçada com co-factor (S9) preparada a partir de fígados de roedores tratados com agentes de indução enzimática, como por exemplo Aroclor 1254 (ver nota 6) (ver nota 7) (ver nota 8) (ver nota 9) ou uma mistura de fenobarbitona e (beta)-naftoflavona (ver nota 10) (ver nota 11) (ver nota 12).

A fracção pós-mitocondrial é geralmente utilizada em concentrações na gama dos 1%-10% v/v no meio de ensaio final. O estado do sistema de activação metabólica pode depender da classe dos produtos químicos em estudo. Em alguns casos pode revelar-se adequado utilizar várias concentrações diferentes de fracção pós-mitocondrial.

Progressos tais como a elaboração por engenharia genética de linhas celulares que expressem enzimas de activação específicos oferecem possibilidades de activação endógena. A escolha das linhas celulares a utilizar terá de ser cientificamente justificada (por exemplo: pela relevância do isoenzima de citocromo P450 para o metabolismo da substância em estudo).

1.4.1.5 Substância em estudo/preparação

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes de serem adicionadas às células. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2 Condições de ensaio

1.4.2.1 Solvente/veículo

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, devendo ser compatível com a sobrevivência das células e com a actividade da mistura S9. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de solventes/veículos aquosos. Quando forem realizados ensaios de substâncias

instáveis na presença de água, os solventes orgânicos utilizados devem ser anidros. A água poderá ser removida através de um filtro molecular.

1.4.2.2 Concentrações de exposição

A citotoxicidade, a solubilidade no sistema de ensaio e as alterações do pH ou da pressão osmótica constituem alguns dos critérios a ter em conta na determinação da concentração máxima.

A citotoxicidade deve ser determinada na experiência principal tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica, por recurso a um indicador adequado da integridade e do crescimento celulares, nomeadamente o grau de confluência, as contagens de células viáveis ou o índice mitótico. Poderá ser útil determinar previamente a citotoxicidade e solubilidade através de uma experiência preliminar.

Devem utilizar-se pelo menos três concentrações analisáveis. No caso de substâncias que sejam citotóxicas, as concentrações utilizadas devem abranger uma gama compreendida entre a toxicidade máxima e uma toxicidade reduzida ou nula; o que significa geralmente que as concentrações devem variar num factor de 2 a (ver fórmula no documento original). No momento da colheita, a concentração máxima deve determinar uma redução significativa (superior a 50%) do grau de confluência, da contagem de células viáveis e do índice mitótico. O índice mitótico constitui uma medida indirecta dos efeitos citotóxicos/citostáticos, dependendo do tempo decorrido após a exposição. Todavia, a sua utilização é aceitável no caso de culturas em suspensão, em que os restantes métodos de determinação da toxicidade podem revelar-se fastidiosos ou impraticáveis. Os dados relativos à cinética do ciclo celular, nomeadamente o tempo médio de geração (TMG), podem ser utilizados como informação suplementar. O TMG constitui, no entanto, uma média global, que nem sempre permite identificar a existência de subpopulações com um crescimento menos rápido, podendo acontecer em alguns casos que ligeiros aumentos do TMG possam resultar em atrasos muito substanciais no que respeita ao surgimento de aberrações.

No caso de substâncias sem efeitos citotóxicos consideráveis, a concentração máxima do ensaio deve ser a mais baixa de 5 (ml)/ml, 5 mg/ml ou 0,01 M.

Para substâncias relativamente insolúveis que não sejam tóxicas em concentrações inferiores à concentração insolúvel, a dose máxima a utilizar deve corresponder a uma concentração acima do limite de solubilidade no meio de cultura final após o período de exposição. Em alguns casos (por exemplo: quando a toxicidade apenas ocorre em concentrações superiores à menor concentração insolúvel) é conveniente ensaiar mais de uma concentração com precipitação visível. Poderá ser útil avaliar a solubilidade no início e no fim da exposição, uma vez que a mesma se pode alterar durante a exposição no sistema de ensaio devido à presença de células, de S9, de soro, etc. A insolubilidade pode ser detectada à vista desarmada. O precipitado não deve interferir com as contagens necessárias.

1.4.2.3 Controlos negativos e positivos

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo), tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica. Quando for utilizada activação metabólica, o produto químico de controlo positivo deve ser o mesmo que exige a activação para dar uma resposta mutagénica.

Para os controlos positivos deve ser utilizado um agente clastogénico conhecido aos níveis de exposição esperados, de forma a obter um aumento detectável e reprodutível ao longo do tempo que permita demonstrar a sensibilidade do sistema de ensaio.

As concentrações do controlo positivo devem ser escolhidas de modo que os seus efeitos sejam claros, devendo ser utilizadas lâminas codificadas de forma que não sejam imediatamente identificáveis pela pessoa que procede à leitura. As substâncias de controlo positivo podem ser, por exemplo:

(ver quadro no documento original)

Podem utilizar-se no controlo positivo outras substâncias adequadas. A possibilidade de utilização de produtos químicos de uma classe afim para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam.

Para cada colheita devem também realizar-se controlos negativos, em que as células são expostas apenas ao solvente ou veículo e ao meio de tratamento, procedendo-se do mesmo modo que num ensaio normal. Além disso, devem igualmente ser utilizados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que já existam dados de controlo que demonstrem que o solvente escolhido não induz nenhum efeito deletério ou mutagénico.

1.4.3 Procedimento

1.4.3.1 Exposição à substância em estudo

As células em crescimento são expostas à substância em estudo na presença e na ausência de um sistema de activação metabólica. Os linfócitos devem ser expostos à substância em estudo cerca de 48 horas após o estímulo mitogénico.

1.4.3.2 Normalmente, devem ser utilizadas culturas em duplicado para cada concentração, sendo fortemente recomendada a utilização de culturas em duplicado também para os controlos negativos/solventes. Quando puder ser demonstrado, a partir dos dados de experiências anteriores, que a diferença entre as culturas duplicadas é mínima (ver nota 13) (ver nota 14), pode aceitar-se a utilização de uma única cultura para cada concentração.

As substâncias gasosas ou voláteis devem ser ensaiadas por métodos apropriados, por exemplo em recipientes selados (ver nota 15) (ver nota 16).

1.4.3.3 Intervalo de amostragem das culturas

No primeiro ensaio, as células são expostas à substância em estudo, na presença e na ausência de um sistema de activação metabólica, durante 3-6 horas, sendo colhidas a intervalos equivalentes a cerca de 1,5 ciclos celulares normais, a partir do início da exposição (ver nota 12). Se este protocolo der resultados negativos tanto na presença como na ausência de um sistema de activação, deve ser realizada uma experiência adicional sem activação, com exposição em contínuo até à colheita, passado um tempo equivalente a 1,5 ciclos celulares normais. Certos produtos químicos podem ser detectados mais facilmente com tempos de exposição/colheita superiores a 1,5 ciclos celulares. Os resultados negativos com activação metabólica terão de ser confirmados caso a caso. Nos casos em que a confirmação dos resultados negativos não seja considerada necessária, deve ser apresentada uma justificação.

1.4.3.4 Preparação dos cromossomas

As culturas de célula são tratadas com Colcemid(marca registada) ou colchicina, geralmente durante 1-3 horas antes da colheita. Procede-se à colheita individual das culturas e ao respectivo processamento, com vista à preparação dos cromossomas, que inclui o tratamento hipotónico das células, seguido de fixação e coloração.

1.4.3.5 Análise

Todas as lâminas, incluindo as provenientes dos lotes de controlo positivo e negativo, devem ser independentemente codificadas antes da análise microscópica. Uma vez que os processos de fixação dão frequentemente lugar à ruptura de uma determinada proporção das células em metafase, com perda dos cromossomas, as células contabilizadas devem apresentar, para todos os tipos de célula, um número de centrómeros igual ao número modal (mais ou menos) 2. Devem ser contabilizadas pelo menos 200 metafases com uma boa distribuição para cada concentração e para o controlo, com boa concordância entre os replicados, quando existam. Esse número pode ser inferior caso se observe um número elevado de aberrações.

Embora o objectivo do ensaio consista na detecção de aberrações cromossómicas estruturais, devem registar-se os casos de poliploidia e de endoreduplicação, quando ocorram.

2 Dados

2.1 Tratamento dos resultados

A unidade experimental é a célula, pelo que se deve avaliar a percentagem de células que apresentam uma aberração cromossómica estrutural. Os diferentes tipos de aberração cromossómica estrutural devem ser enumerados e discriminados pelo seu número e frequência nas culturas experimentais e de controlo. A ocorrência de lacunas é registada em separado e incluída no relatório, mas não é geralmente contabilizada para o cálculo da frequência total das aberrações.

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

Devem ser fornecidos dados individuais para cada cultura, para além de um quadro com o resumo dos dados globais.

Não é necessário comprovar uma reacção positiva inequívoca. Os resultados ambíguos devem ser esclarecidos através de experiências adicionais, de preferência com modificação das condições experimentais. A necessidade de confirmar os resultados negativos já foi discutida no ponto 1.4.3.3. As experiências subsequentes devem contemplar a modificação dos parâmetros de estudo, por forma a alargar a gama de condições avaliadas. Os parâmetros de estudo que podem ser alterados incluem a gama e os intervalos entre as diferentes concentrações e as condições da activação metabólica.

2.2 Avaliação e interpretação dos resultados

Existem vários critérios para determinar um resultado positivo, nomeadamente o aumento do número de células com aberrações cromossómicas relacionado com a concentração ou que seja reprodutível. Deve atender-se, antes de mais, à importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos (ver nota 3) (ver nota 13), embora a significância estatística não deva ser o único elemento para a determinação de uma resposta positiva.

Um aumento do número de células poliplóides pode indicar que a substância em estudo apresenta o potencial de inibir a mitose e de induzir aberrações cromossómicas numéricas. Um aumento do número de células com cromossomas endoreduplicados pode indicar que a substância em estudo apresenta o potencial de inibir a progressão do ciclo celular (ver nota 17) (ver nota 18).

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios supra é considerada não mutagénica para o sistema em causa.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos, independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio in vitro de aberrações cromossómicas indica que a substância em estudo induz aberrações cromossómicas estruturais nas células somáticas de mamíferos em cultura. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz aberrações cromossómicas estruturais nas células somáticas de mamíferos em cultura.

3 Apresentação de relatórios

Relatório de ensaio

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

- justificação para a escolha do veículo;
- solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/veículo, se conhecida.

Células:

- tipo e origem das células;

- características do cariótipo e adequação do tipo de células utilizado;
- ausência de micoplasma, quando aplicável;
- informação sobre a duração do ciclo celular;
- sexo dos doadores de sangue, sangue completo ou linfócitos, agente mitogénico utilizado;
- número de passagens, quando aplicável;
- métodos de manutenção da cultura celular, quando aplicável;
- número modal de cromossomas.

Condições de ensaio:- identificação e concentração da substância que pára a metafase, duração da exposição da célula;

- justificação para a selecção das concentrações e do número de culturas, incluindo, por exemplo, dados sobre a citotoxicidade e sobre as limitações de solubilidade, quando disponíveis;
- concentração da substância em estudo;
- volumes adicionados do veículo e da substância em estudo;
- temperatura de incubação;
- tempo de incubação;
- duração da exposição;
- densidade celular da cultura de arranque, quando aplicável;
- tipo e composição do sistema de activação metabólica, incluindo critérios de aceitabilidade;
- controlos positivos e negativos;
- métodos de preparação das lâminas;
- critérios de contabilização das aberrações;
- número de células em metafase analisadas;
- métodos de determinação da toxicidade;
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo.

Resultados:

- sinais de toxicidade, ou seja, grau de confluência, dados relativos ao ciclo celular, contagens de células, índice mitótico;
- sinais de precipitação;
- dados sobre o pH e a pressão osmótica do meio de tratamento, caso tenham sido determinados;
- definição das aberrações observadas, incluindo as lacunas;
- número de células em que se observa uma aberração cromossómica e tipo dessas aberrações, discriminados para cada cultura exposta e de controlo;
- alterações da ploidia, quando observadas;
- relação dose-resposta, quando seja possível de determinar;
- análise estatística, quando tenha sido realizada;
- dados relativos ao controlo negativo (solvente/veículo) e positivo realizados em paralelo com o ensaio;
- dados históricos sobre o controlo negativo (solvente/veículo) e positivo, com as respectivas gamas, valores médios e desvios-padrão.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4 Bibliografia

(nota 1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, vol. 4, Hollaender, A. (ed.) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.

(nota 2) Ishidate, M. Jr., and Sofuni, T. (1985), The In Vitro Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in Progress in Mutation

Research, vol. 5, Ashby, J. et al. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 427-432.

(nota 3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Andersen, G., and Zeiger, E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl. 10), pp. 1-175.

(nota 4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J., and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147-204.

(nota 5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I., and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Res.*, 268, pp. 297-305.

(nota 6) Ames, B. N., McCann, J., and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.

(nota 7) Maron, D. M., and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.

(nota 8) Natarajan, A. T., Tate, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M., and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System In Vitro, J. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res.*, 37, pp. 83-90.

(nota 9) Matsuoka, A., Hayashi, M., and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix In Vitro, *Mutation Res.*, 66, pp. 277-290.

(nota 10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M., and Wolf, R. C. (1992), Report of UK environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.

(nota 11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K., and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F. J., Fouts, J. R., Berid, J. R., and Philpot, R. M. (eds), *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(nota 12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Iven, J. L., Kirkland, D. J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994), Report from Working Group on in In Vitro Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.*, 312, pp. 241-261.

(nota 13) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O., and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(nota 14) Soper, K. A., and Galloway, S. M. (1994), Replicate Rasks are not Necessary for In Vitro Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res.*, 312, pp. 139-149.

(nota 15) Krahn, D. F., Barsky, F. C., and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds.), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.

(nota 16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P., and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.

(nota 17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.

(nota 18) Huang, Y., Change, C., and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364.

ANEXO V

B.11 Mutagenicidade - Ensaio in vivo de aberrações cromossómicas em células da medula de mamíferos

1 Método

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 475 - Ensaio de aberrações cromossómicas em células da medula de mamíferos (1977).

1.1 Introdução

O ensaio de aberrações cromossómicas em células da medula de mamíferos é utilizado para a detecção de aberrações cromossómicas estruturais induzidas pela substância em estudo em células da medula de animais geralmente roedores (ver nota 1) (ver nota 2) (ver nota 3) (ver nota 4). As aberrações estruturais podem ser de dois tipos, afectando os cromossomas ou os cromátídeos. A maior parte dos mutagénicos químicos induzem aberrações cromatídicas, mas também podem ocorrer aberrações cromossómicas. Um aumento da taxa de poliploidia pode indicar que um determinado produto químico tem potencial para induzir aberrações numéricas. As mutações cromossómicas e eventos relacionados causam diversas doenças genéticas humanas, existindo provas substanciais de que as alterações que causam nos oncogenes e nos genes supressores de tumores das células somáticas estão envolvidas na indução de cancro nos seres humanos e em animais utilizados em experiências.

Os animais utilizados no presente ensaio são geralmente roedores. A medula é o tecido objectivo do ensaio, por se tratar de um tecido altamente vascularizado e que contém uma população de células com grande ritmo de duplicação e que podem ser facilmente isoladas e processadas. O presente método não se destina à aplicação noutras espécies animais ou tecidos objectivo.

O presente ensaio de aberrações cromossómicas é particularmente relevante para a avaliação dos riscos mutagénicos, uma vez que permite tomar em consideração os factores do metabolismo in vivo, da farmacocinética e dos processos de reparação do ADN, embora estes possam variar de espécie para espécie e de tecido para tecido. Os ensaios in vivo são igualmente úteis para a investigação complementar de efeitos mutagénicos detectados através de ensaios in vitro.

Se existirem provas de que nem a substância em estudo nem nenhum dos seus metabolitos reactivos entram em contacto com o tecido objectivo, o presente ensaio não é apropriado.

V. também a parte B da introdução geral.

1.2 Definições

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

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

Endoreduplicação: processo no qual, após um período S de replicação do ADN, o núcleo não entra em mitose iniciando um novo período S. O resultado são cromossomas com 4, 8, 16, ... cromátídeos.

Lacuna: lesão acromática de extensão inferior à largura de um cromátídeo e que determine um ligeiro desalinhamento do mesmo.

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

Poliploidia: número de cromossomas múltiplo do número haplóide (n), mas diferente do número diplóide (ou seja, $3n$, $4n$, etc.).

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

1.3 Princípio do método de ensaio

Os animais são expostos à substância em estudo através de um modo de exposição apropriado, sendo sacrificados passado o tempo necessário após a exposição. Antes do sacrifício, os animais são tratados com um produto fixador da metafase (por exemplo: colchicina ou Colcemid(marca registada)). Seguidamente, são feitas preparações de cromossomas a partir das células de medula onde, após coloração, as células em metafase são analisadas para detecção de aberrações cromossómicas.

1.4 Descrição do método de ensaio

1.4.1 Preparação

1.4.1.1 Selecção das espécies animais

Geralmente, são utilizados ratos, ratazanas ou hamsters chineses, embora possa ser utilizada qualquer outra espécie de mamífero apropriada. Devem ser utilizados animais adultos saudáveis jovens das raças de laboratório mais comuns. No início do estudo, a variação de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder (mais ou menos) 20% do peso médio de cada sexo.

1.4.1.2 Condições de acomodação e alimentação

Devem ser aplicadas as condições gerais referidas na introdução geral, parte B, embora o objectivo para a humidade deva ser de 50%-60%.

1.4.1.3 Preparação dos animais

Os animais adultos saudáveis jovens são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. As gaiolas devem ser dispostas de modo que eventuais, efeitos devidos à respectiva colocação sejam minimizados. Os animais são identificados de forma inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias.

1.4.1.4 Preparação das doses

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes de serem adicionadas às células. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2 Condições do ensaio

1.4.2.1 Solvente/veículo

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo nem produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de solventes/veículos aquosos.

1.4.2.2 Controlos

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo) para cada sexo. Com excepção da exposição à substância em estudo, todos os animais, incluindo os dos grupos de controlo, devem ser manuseados de forma idêntica.

Os controlos positivos devem produzir aberrações estruturais in vivo aos níveis a que se espera o surgimento de um aumento detectável em relação à linha de base. A dose a administrar para o controlo positivo deve ser escolhida de modo que os seus efeitos sejam claros mas também a que as lâminas codificadas não sejam imediatamente identificadas pela pessoa que procede às leituras. É aceitável que o controlo positivo seja administrado por uma via diferente da substância em estudo e que só seja realizada uma amostra. A possibilidade de

utilização de produtos químicos de uma classe relacionada para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam. As substâncias de controlo positivo podem incluir, por exemplo:

(ver quadro no documento original)

Para cada colheita devem também realizar-se controlos negativos, em que os animais são expostos apenas ao solvente ou veículo, procedendo-se do mesmo modo que num ensaio normal, a menos que existam dados históricos de controlo aceitáveis em relação à variabilidade de animal para animal e à frequência da ocorrência de células com aberrações cromossómicas. Se só estiver prevista uma amostra dos controlos negativos, a altura mais apropriada é a primeira amostra. Além disso, devem igualmente ser utilizados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que já existam dados de estudos anteriores ou publicados que mostrem que o solvente/veículo escolhido não induz nenhum efeito deletério ou mutagénico.

1.5 Procedimento

1.5.1 Número e sexo dos animais

Cada grupo de estudo e de controlo deve incluir pelo menos cinco animais analisáveis por sexo. Se no momento do estudo existirem dados disponíveis de estudos com as mesmas espécies e com utilização da mesma via de administração que demonstrem que não há qualquer diferença substancial da toxicidade entre os sexos, será suficiente testar um único sexo. Nos casos em que a exposição humana aos produtos químicos possa ser específica a cada sexo, como acontece com alguns produtos farmacêuticos, o ensaio deve ser executado com animais do sexo em causa.

1.5.2 Programação do tratamento

As substâncias de ensaio são preferivelmente administradas numa única exposição, podendo igualmente ser administradas numa dose dividida, ou seja, duas exposições no mesmo dia. Separadas por apenas algumas horas, para facilitar a administração de grandes volumes. Qualquer outro regime de administração terá de ser cientificamente justificado.

Devem ser colhidas duas amostras separadas, após exposição durante um dia. Para os roedores, a primeira amostra deve ser colhida 1,5 ciclos celulares normais (que é normalmente de 12-18 horas) após a exposição. Dado que o tempo necessário para a absorção e metabolismo da substância em estudo, bem como o seu efeito sobre a cinética do ciclo celular, podem afectar o momento óptimo para a detecção de uma eventual aberração cromossómica, recomenda-se a recolha de uma segunda amostra 24 horas após a primeira. Se forem utilizados regimes de administração ao longo de mais de um dia, deve ser colhida uma amostra, 1,5 ciclos celulares normais após a exposição final.

Antes do sacrifício, os animais são injectados intraperitonealmente com uma dose apropriada de um agente de fixação da metafase (por exemplo: Colcemid(marca registada) ou colchicina). As amostras serão colhidas a intervalos regulares, correspondentes a aproximadamente 3-5 horas para os ratos e a 4-5 horas para os hamsters chineses, a partir desse momento. As células da medula são colhidas e analisadas para detecção de aberrações cromossómicas.

1.5.3 Doses

Se for realizado um estudo para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados, esse estudo deve ser executado no mesmo laboratório, utilizando as mesmas espécies, linha celular, sexo e regime de exposição a utilizar no estudo principal (ver nota 5). Se a substância for tóxica, deverão ser utilizadas três doses diferentes para a primeira amostragem, abrangendo uma gama compreendida entre a toxicidade máxima e uma toxicidade reduzida ou quase nula. Na segunda amostragem só será necessário avaliar a dose máxima, que é definida como a dose que produz sinais de toxicidade tais que indiquem que a utilização de doses superiores, com o mesmo regime de administração, produzirá

mortalidade. As substâncias com actividade biológica específica em doses baixas e não tóxicas (como acontece com as hormonas e agentes mitogénicos) poderão constituir uma excepção aos critérios de fixação da dose, devendo ser avaliadas caso a caso. A dose máxima pode igualmente ser definida como a dose que produz algumas indicações de toxicidade na medula (por exemplo: uma redução superior a 50% do índice mitótico).

1.5.4 Ensaio limite

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se, com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, não for previsível a existência de toxicidade genética, poderá não ser considerado necessário um estudo completo com utilização de três doses diferentes. Para os estudos de maior duração, a dose limite é de 2000 mg/kg de peso corporal/dia para as exposições até 14 dias e de 1000 mg/kg de peso corporal/dia para as exposições de duração superior a 14 dias. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios limite.

1.5.5 Administração das doses

A substância em estudo é geralmente administrada por sonda esofágica, utilizando um tubo estomacal ou cânula de intubação apropriada, ou por injeção intraperitoneal. Poderão ser aceites, mediante justificação, outras vias de administração. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez por sonda esofágica ou por injeção depende também do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes mais elevados deve ser justificada. Com excepção das substâncias que causem irritação ou que sejam corrosivas, cujos efeitos serão normalmente agravados em concentrações mais altas, a variabilidade do volume de ensaio deve ser minimizada através do ajustamento das concentrações, por forma a garantir um volume constante e independente da dose a administrar.

1.5.6 Preparação dos cromossomas

Imediatamente após o sacrifício, a medula é colhida, exposta a uma solução hipotónica e fixada. As células são depois esfregadas em lâminas e coradas.

1.5.7 Análise

O índice mitótico deve ser determinado como medição da citotoxicidade em pelos menos 1000 células por animal para todos os animais expostos à substância em estudo (incluindo os controlos positivos) e para os animais não expostos do controlo negativo.

Devem ser analisadas pelo menos 100 células de cada animal. Este número poderá ser menor quando se verificarem taxas elevadas de aberrações. Todas as lâminas, incluindo as provenientes dos lotes de controlo positivo e negativo, devem ser independentemente codificadas antes da análise microscópica. Uma vez que os processos de fixação dão frequentemente lugar à ruptura de uma determinada proporção das células em metafase, com perda dos cromossomas, as células contabilizadas devem apresentar, para todos os tipos de célula, um número de centrómeros igual ao número modal (mais ou menos) 2.

2 Dados

2.1 Tratamento dos resultados

Os dados respeitantes a cada animal devem ser apresentados num quadro. A unidade experimental é o animal. Para cada animal devem ser apresentados o número de células contabilizadas, o número de aberrações por célula e a percentagem de células com aberrações cromossómicas estruturais. Os diferentes tipos de aberração cromossómica estrutural devem ser enumerados, com os respectivos números e frequências, para os grupos expostos à substância em estudo e para os grupos de controlo. A ocorrência de lacunas é registada em separado e incluída no relatório, mas não é geralmente contabilizada para o cálculo da frequência total das aberrações. Se não houver qualquer evidência de uma diferença na

resposta entre os sexos, os dados de ambos os sexos poderão ser combinados para fins estatísticos.

2.2 Avaliação e interpretação dos resultados

Existem vários critérios para determinar um resultado positivo, nomeadamente o aumento do número de células com aberrações cromossómicas relacionado com a concentração ou um claro aumento do número de células com aberrações num determinado grupo, ou numa determinada amostra. Deve atender-se, antes de mais, à importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios poderão ser utilizados métodos estatísticos (ver nota 6), embora a significância estatística não deva ser o único elemento para a determinação de uma resposta positiva. Os resultados ambíguos devem ser esclarecidos através de estudos adicionais, de preferência com modificação das condições experimentais.

Um aumento do número de células poliplóides pode indicar que a substância em estudo apresenta o potencial de inibir a mitose e de induzir aberrações cromossómicas numéricas. Um aumento do número de células com cromossomas endoreduplicados pode indicar que a substância em estudo apresenta o potencial de inibir a progressão do ciclo celular (ver nota 7) (ver nota 8).

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios supra no presente ensaio é considerada não mutagénica.

Embora a maioria das experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos, independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio in vitro de aberrações cromossómicas indica que a substância em estudo induz aberrações cromossómicas estruturais nas células da medula das espécies testadas. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz aberrações cromossómicas estruturais nas células da medula das espécies testadas. Deve ser discutida a probabilidade de a substância em estudo ou os seus metabolitos alcançarem o sistema circulatório geral ou especificamente o tecido objectivo (ou seja, a toxicidade sistémica).

3 Apresentação de relatórios

Relatório de ensaio

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

- justificação para a escolha do veículo;
- solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/veículo, se conhecida.

Animais de ensaio:

- espécie/linha celular utilizada;
- número, idade e sexo dos animais;
- origem, condições de acomodação, alimentação, etc.;
- peso de cada animal no início do ensaio, incluindo a gama de pesos, a respectiva média e o desvio padrão para cada grupo.

Condições de ensaio:

- controlos positivos e negativos (veículo/solvente);
- resultados do estudo para definição da gama de doses, quando tenha sido realizado;
- justificação para a selecção das doses;
- preparação da substância em estudo;
- modo de administração da substância em estudo;
- justificação da via de administração escolhida;

- método para a verificação de que a substância em estudo atingiu a circulação geral ou o tecido objectivo, quando aplicável;
- conversão da concentração da substância em estudo (ppm) na alimentação/abeberação para a dose real (mg/kg peso corporal/dia), quando aplicável;
- qualidade dos alimentos e da água;
- descrição pormenorizada dos calendários de exposição e amostragem;
- métodos de medição da toxicidade;
- substância utilizada para fixar a metafase, respectiva concentração e duração de exposição;
- métodos de preparação das lâminas;
- critérios de contabilização das aberrações;
- número de células analisadas por animal;
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo.

Resultados:

- sinais de toxicidade;
- índice mitótico;
- tipo e número de aberrações observadas em cada animal;
- número total de aberrações em cada grupo, com as respectivas médias e desvios padrão;
- número de células aberrantes em cada grupo, com as respectivas médias e desvios padrão;
- alterações da ploidia, quando observadas;
- relação dose-resposta, quando seja possível de determinar;
- análise estatística, quando tenha sido realizada;
- dados relativos ao controlo negativo realizado em paralelo com o ensaio;
- dados históricos sobre o controlo negativo com as respectivas gamas, valores médios e desvios padrão;
- dados relativos ao controlo positivo realizado em paralelo com o ensaio.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4 Bibliografia

(nota 1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, S. Venitt and J. M. Parry (eds.), IRL Press, Oxford, Washington D. C., 275-306.

(nota 2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F., and Shelby, M. (1987), Mammalian In Vivo Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, Mutation Res., 189, 157-165.

(nota 3) Richold, M., Chandly, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G., Bootman, J., and Henderson, L. (1990), In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report, part I, revised, Cambridge University Press, Cambridge, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(nota 4) Tice, R. R., Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Paccierotti, F., Preston, R. J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S., and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the In Vivo Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, Mutation Res., 312, pp. 305-312.

(nota 5) Fielder, R. J., Alleen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J., and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK, Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 313-319.

(nota 6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G., and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing

Report, part III, Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, D. J., Kirkland (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(nota 7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.

(nota 8) Huang, Y., Change, C., and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364.

ANEXO VI

B.12 Mutagenicidade - Ensaio in vivo dos micronúcleos em eritrócitos de mamíferos

1 Método

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 474 - Ensaio dos micronúcleos em eritrócitos de mamíferos (1997).

1.1 Introdução

O ensaio in vivo dos micronúcleos de mamíferos é utilizado para a detecção de danos induzidos pela substância em estudo nos cromossomas ou no aparelho mitótico dos eritroblastos, através da análise dos eritrócitos retirados da medula e ou de células de sangue periférico de animais, geralmente roedores.

O objectivo do ensaio do micronúcleo é identificar substâncias que causam danos citogénicos, dando lugar à formação de micronúcleos com fragmentos de cromossoma ou com cromossomas inteiros.

Quando um eritroblasto da medula se desenvolve para dar um eritrócito policromático, o núcleo principal é expulso: qualquer micronúcleo que tenha sido formado pode «ficar para trás» (lagging), no citoplasma, onde não deveria existir qualquer material nuclear. A visualização dos micronúcleos é facilitada nestas células, uma vez que não existe um núcleo principal. Um aumento de frequência de eritrócitos policromáticos, micronucleados, nos animais expostos à substância em estudo representa uma indicação de danos cromossómicos induzidos.

Para o presente ensaio utiliza-se normalmente a medula de roedores, uma vez que os eritrócitos policromáticos são produzidos nesse tecido. A medição dos eritrócitos (policromáticos) imaturos micronucleados no sangue periférico é igualmente aceitável para qualquer outra espécie em que tenha sido demonstrado que o baço não tem a capacidade de eliminar os eritrócitos micronucleados ou que apresente uma sensibilidade adequada para a detecção de agentes que causam aberrações cromossómicas estruturais ou numéricas. Os micronúcleos podem ser distinguidos por alguns critérios, que incluem a identificação da presença ou ausência de um centrómero ou de ADN centromérico nos micronúcleos. A frequência dos eritrócitos (policromáticos) imaturos micronucleados é o principal ponto final utilizado. A proporção de eritrócitos (normocromáticos) maduros com micronúcleos no sangue periférico pode igualmente ser utilizada como ponto final do ensaio, quando os animais forem expostos à substância em estudo de forma contínua durante quatro semanas ou mais.

O ensaio in vivo do micronúcleo de mamíferos é particularmente relevante para a avaliação dos perigos mutagénicos, uma vez que permite a avaliação dos elementos metabólicos, da farmacocinética e dos processos de reparação do ADN in vivo, embora estes possam variar de espécie para espécie, de tecido para tecido e em termos do ponto final genético. Os ensaios in vivo são igualmente úteis para a investigação suplementar de um efeito mutagénico detectado in vitro.

Se existirem provas de que nem a substância em estudo nem nenhum dos seus metabolitos reactivos entram em contacto com o tecido objectivo, o presente ensaio não é apropriado.

V. também a parte B da introdução geral.

1.2 Definições

Centrómero: região(ões) de um cromossoma a que estão associadas fibras fusiformes durante a divisão celular, permitindo o movimento ordeiro dos cromossomas para os pólos da célula.

Micronúcleos: pequenos núcleos separados e adicionais dos núcleos das células principais, produzidos durante a telefase da mitose (meiose) por fragmentos do cromossoma ou cromossomas inteiros que «ficam para trás» (lagging).

Eritrócito normocromático: eritrócito maduro a que faltam ribossomas e que pode, por conseguinte, distinguir-se dos eritrócitos policromáticos imaturos por coloração selectiva dos ribossomas.

Eritrócito policromático: eritrócito imaturo, numa fase de desenvolvimento intermediária, que ainda contém ribossomas e pode, por conseguinte, distinguir-se dos eritrócitos normocromáticos maduros por coloração selectiva dos ribossomas.

1.3 Princípio do método de ensaio

Os animais são expostos à substância em estudo por uma via apropriada. Se for utilizada a medula, os animais são sacrificados passado o tempo necessário após a exposição, a medula é extraída e são feitas preparações coradas (ver nota 1) (ver nota 2) (ver nota 3) (ver nota 4) (ver nota 5) (ver nota 6) (ver nota 7). Quando é utilizado o sangue periférico, o sangue é recolhido passado o tempo necessário após a exposição e são preparados esfregaços corados (ver nota 4) (ver nota 8) (ver nota 9) (ver nota 10). Nos estudos com sangue periférico, as amostras de célula devem ser colhidas tão cedo quanto possível após a última exposição à substância em estudo. As preparações são analisadas para a presença de micronúcleos.

1.4 Descrição do método de ensaio

1.4.1 Preparação

1.4.1.1 Selecção das espécies animais

Quando se pretender utilizar preparações da medula, recomenda-se a utilização de ratos ou ratazanas, embora possa ser utilizada qualquer espécie de mamífero que seja apropriada. Quando se utilizar o sangue periférico, recomenda-se a utilização de ratos. Contudo, pode ser utilizada qualquer espécie de mamífero que seja apropriada, desde que se trate de uma espécie em que o baço não remove os eritrócitos micronucleados ou que apresente uma sensibilidade adequada para a detecção de agentes que causam aberrações cromossómicas estruturais ou numéricas. Devem ser utilizados animais saudáveis jovens de linhas de laboratório com características bem conhecidas. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder (mais ou menos) 20% do peso médio de cada sexo.

1.4.1.2 Condições de acomodação e alimentação

Devem ser aplicadas as condições gerais referidas na introdução geral, parte B, embora o objectivo para a humidade deva ser de 50%-60%.

1.4.1.3 Preparação dos animais

Os animais adultos saudáveis jovens são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. Os animais são identificados de forma inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias. As gaiolas devem ser dispostas de modo que eventuais efeitos devidos à respectiva colocação sejam minimizados.

1.4.1.4 Preparação das doses

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes de serem administradas aos animais. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2 Condições do ensaio

1.4.2.1 Solvente/veículo

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo nem produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de solventes/veículos aquosos.

1.4.2.2 Controlos

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo) para cada sexo. Com excepção da exposição à substância em estudo, todos os animais, incluindo os dos grupos de controlo, devem ser manuseados de forma idêntica.

Os controlos positivos devem produzir micronúcleos *in vivo* aos níveis de exposição a que se espera o surgimento de um aumento detectável em relação à linha de base. A dose de controlo positivo a administrar deve ser escolhida de modo que os seus efeitos sejam claros mas também a que as lâminas codificadas não sejam imediatamente identificadas pela pessoa que procede às leituras. É aceitável que o controlo positivo seja administrado por uma via diferente da substância em estudo e que só seja realizada uma amostra. A possibilidade de utilização de produtos químicos de uma classe relacionada para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam. As substâncias de controlo positivo podem incluir, por exemplo:

(ver quadro no documento original)

Para cada colheita devem também realizar-se controlos negativos, em que os animais são expostos apenas ao solvente ou veículo, procedendo-se do mesmo modo que num ensaio normal, a menos que existam dados históricos de controlo aceitáveis em relação à variabilidade de animal para animal e à frequência da ocorrência de células com aberrações cromossómicas. Se só estiver prevista uma amostra dos controlos negativos, a altura mais apropriada é a primeira amostra. Além disso, devem igualmente ser utilizados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que já existam dados de estudos anteriores ou publicados que mostrem que o solvente/veículo escolhido não induz nenhum efeito deletério ou mutagénico.

Se for utilizado o sangue periférico, uma amostra anterior à exposição poderá servir para o controlo negativo, mas apenas nos estudos de menor duração (ou seja, 1 a 3 exposições), desde que os dados respeitantes a essa amostra estejam de acordo com o esperado em função de experiências anteriores.

1.5 Procedimento

1.5.1 Número e sexo dos animais

Cada grupo exposto e de controlo deve incluir pelo menos cinco animais analisáveis por sexo (ver nota 11). Se no momento do estudo existirem dados disponíveis de estudos com as mesmas espécies e com utilização da mesma via de administração que demonstrem que não há qualquer diferença substancial da toxicidade entre os sexos, será suficiente testar um único sexo. Nos casos em que a exposição humana aos produtos químicos possa ser específica a cada sexo, como acontece com alguns produtos farmacêuticos, o ensaio deve ser executado com animais do sexo em causa.

1.5.2 Programação do tratamento

Não é possível recomendar qualquer programação específica para a exposição (ou seja, uma, duas ou mais exposições com intervalos de 24 horas). As amostras recolhidas durante regimes de administração prolongada são aceitáveis, desde que o estudo demonstre a existência de um efeito positivo ou, para um estudo negativo, desde que a toxicidade seja demonstrada ou que se utilize uma dose limite, com administração até ao momento da colheita. As substâncias de ensaio podem igualmente ser administradas numa dose dividida, ou seja, duas exposições no mesmo dia, separadas por apenas algumas horas, para facilitar a administração de grandes volumes.

O ensaio pode ser executado de duas formas:

a) Os animais são expostos à substância em estudo uma única vez. As amostras de medula são colhidas pelo menos duas vezes, a primeira das quais pelo menos 24 horas após a exposição, com intervalos apropriados entre as colheitas mas não ultrapassando as 48 horas após a exposição. Uma eventual colheita antes de 24 horas após a exposição terá de ser justificada. As amostras de sangue periférico são colhidas pelo menos duas vezes, a primeira das quais pelo menos 36 horas após a exposição, com intervalos apropriados entre as colheitas mas não ultrapassando as 72 horas após a exposição. Quando for identificada uma resposta positiva numa determinada colheita, não será necessário continuar o estudo;

b) Se forem utilizadas duas ou mais exposições diárias (por exemplo: duas ou mais exposições com intervalos de 24 horas), a primeira amostra deve ser colhida 18 a 24 horas depois da exposição final no caso do sangue periférico (ver nota 12).

Quando necessário, poderão ser recolhidas amostras adicionais.

1.5.3 Doses

Se for realizado um estudo para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados, esse estudo deve ser executado no mesmo laboratório, utilizando as mesmas espécies, linha celular, sexo e regime de exposição a utilizar no estudo principal (ver nota 13). Se a substância for tóxica, deverão ser utilizadas três doses diferentes para a primeira amostragem, abrangendo uma gama compreendida entre a toxicidade máxima e uma toxicidade reduzida ou quase nula. Na segunda amostragem só será necessário avaliar a dose máxima, que é definida como a dose que produz sinais de toxicidade tais que indiquem que a utilização a doses superiores, com o mesmo regime de administração, produzirá mortalidade. As substâncias com actividade biológica específica em doses baixas e não tóxicas (como acontece com as hormonas e agentes mitogénicos) poderão constituir uma excepção aos critérios de fixação da dose, devendo ser avaliadas caso a caso. A dose máxima pode igualmente ser definida como a dose que produz algumas indicações de toxicidade na medula (por exemplo: redução da proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais na medula ou no sangue periférico).

1.5.4 Ensaio limite

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se, com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, não for previsível a existência de toxicidade genética, poderá não ser considerado necessário um estudo completo com utilização de três doses diferentes. Para os estudos de maior duração, a dose limite é de 2000 mg/kg de peso corporal/dia para as exposições até 14 dias e de 1000 mg/kg de peso corporal/dia para as exposições de duração superior a 14 dias. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios limite.

1.5.5 Administração das doses

A substância em estudo é geralmente administrada por sonda esofágica, utilizando um tubo estomacal ou cânula de intubação apropriada, ou por injeção intraperitoneal. Poderão ser aceites, mediante justificação, outras vias de administração. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez por sonda esofágica ou por injeção depende também do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes mais elevados deve ser justificada. Com excepção das substâncias que causem irritação ou que sejam corrosivas, cujos efeitos serão normalmente agravados em concentrações mais altas, a variabilidade do volume de ensaio deve ser minimizada através do ajustamento das concentrações, por forma a garantir um volume constante e independente da dose a administrar.

1.5.6 Preparação da medula/sangue

As células da medula são retiradas do fêmur ou da tíbia imediatamente após o sacrifício. Geralmente, as células são retiradas do fêmur ou da tíbia, preparadas e coradas de acordo com métodos já definidos. O sangue periférico é retirado da veia caudal ou de outro vaso sanguíneo apropriado. As células de sangue são imediatamente sujeitas a uma coloração supravital (ver nota 8) (ver nota 9) (ver nota 10) ou então são preparados esfregaços que depois são corados. A utilização de uma coloração específica para o ADN [por exemplo: laranja de acridina (ver nota 14) ou pironina-y de milho 33258 plus da Hoechst (ver nota 15)] pode eliminar alguns dos erros associados à utilização de uma coloração não específica para o ADN. Esta vantagem não impossibilita a utilização de colorações convencionais (por exemplo: Giemsa). Outros sistemas [por exemplo: colunas de celulose para remoção das células nucleadas (ver nota 16)] podem igualmente ser utilizados, desde que se demonstre que esses sistemas funcionam de forma adequada para a preparação de micronúcleos em laboratório.

1.5.7 Análise

A proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais (imaturos + maduros) é determinada para cada animal, através da contagem de pelo menos 200 eritrócitos no caso da medula e de 1000 eritrócitos no caso do sangue periférico (ver nota 17). Todas as lâminas, incluindo as dos controlos positivos e negativos devem ser codificadas independentemente antes da análise microscópica. A eventual ocorrência de eritrócitos imaturos micronucleados deve ser analisada em pelo menos 2000 eritrócitos imaturos por animal. A contagem de eritrócitos maduros micronucleados poderá ser utilizada como informação adicional. Ao analisar as lâminas, a proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais não deve ser inferior a 20% do valor de controlo. Quando os animais forem sujeitos a uma exposição contínua durante quatro semanas ou mais, poderão ser também analisados 2000 eritrócitos maduros por animal, para determinação da ocorrência de micronúcleos. Os sistemas automatizados de análise (tratamento de imagens e citometria de fluxo e suspensões celulares) são alternativas aceitáveis à avaliação manual, se apropriadamente justificadas e validadas.

2 Dados

2.1 Tratamento dos resultados

Os dados respeitantes a cada animal devem ser apresentados num quadro. A unidade experimental é o animal. Para cada animal devem ser verificados separadamente o número de eritrócitos imaturos, o número de eritrócitos imaturos micronucleados e a proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais. Quando os animais tiverem sido expostos à substância em estudo em contínuo durante quatro semanas ou mais, devem também ser recolhidos dados em relação aos eritrócitos maduros. Para cada animal deve ser apresentada a proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais e, se for considerado necessário, de eritrócitos maduros micronucleados. Se não houver qualquer evidência de uma diferença na resposta entre os sexos, os dados de ambos os sexos poderão ser combinados para fins estatísticos.

2.2 Avaliação e interpretação dos resultados

Há diversos critérios para determinar um resultado positivo, como por exemplo um aumento do número de células micronucleadas relacionado com a dose ou um claro aumento do número de células micronucleadas num determinado grupo e numa determinada amostragem. Deve ser tomada em consideração, antes de mais, a importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos (ver nota 18) (ver nota 19), embora a significância estatística não deva ser o único elemento para a determinação de uma resposta positiva. Os resultados ambíguos devem ser esclarecidos através de estudos adicionais, de preferência com modificação das condições experimentais.

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios acima indicados no presente ensaio é considerada não mutagénica.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos, independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio dos micronúcleos indica que a substância em estudo induz a ocorrência dos mesmos, como resultado de danos nos cromossomas ou no sistema mitótico dos eritroblastos da espécie testada. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz a ocorrência de micronúcleos nos eritroblastos imaturos da espécie testada.

Deve ser discutida a probabilidade de a substância em estudo ou os seus metabolitos alcançarem o sistema circulatório geral ou especificamente o tecido objectivo (ou seja, a toxicidade sistémica).

3 Apresentação de relatórios

Relatório de ensaio

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

- justificação para a escolha do veículo;
- solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/veículo, se conhecida.

Animais de ensaio:

- espécie/linha celular utilizada;
- número, idade e sexo dos animais;
- origem, condições de acomodação, alimentação, etc.;
- peso de cada animal no início do ensaio, incluindo a gama de pesos, a respectiva média e o desvio padrão para cada grupo.

Condições de ensaio:

- controlos positivos e negativos (veículo/solvente);
- resultados do estudo para definição da gama de doses, quando tenha sido realizado;
- justificação para a selecção das doses;
- preparação da substância em estudo;
- modo de administração da substância em estudo;
- justificação da via de administração escolhida;
- método para a verificação de que a substância em estudo atingiu a circulação geral ou o tecido objectivo, quando aplicável;
- conversão da concentração da substância em estudo (ppm) na alimentação/abeberação para a dose real (mg/kg peso corporal/dia), quando aplicável;
- qualidade dos alimentos e da água;
- descrição pormenorizada dos calendários de exposição e amostragem;
- métodos de preparação das lâminas;
- métodos de medição da toxicidade;
- critérios de contabilização dos eritrócitos imaturos micronucleados;
- número de células analisadas por animal;
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo.

Resultados:

- sinais de toxicidade;
- proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais;
- número de eritrócitos imaturos micronucleados em cada animal;
- médias e desvios padrão dos eritrócitos imaturos micronucleados por grupo;

- relação dose-resposta, quando seja possível de determinar;
- análise estatística e respectivo método;
- dados relativos ao controlo negativo realizado em paralelo com o ensaio e dados históricos sobre o controlo negativo;
- dados relativos ao controlo positivo realizado em paralelo com o ensaio.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4 Bibliografia

(nota 1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid In Vivo Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, pp. 187-190.

(nota 2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 9-15.

(nota 3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G., and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.*, 123, pp. 61-118.

(nota 4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F., and Heddle, J. A. (1990), The In Vivo Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, pp. 29-80.

(nota 5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N., and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp. 555-558.

(nota 6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R., and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, pp. 103-112.

(nota 7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., and Shelby, M. E. (1990), The in vivo Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.*, 14, pp. 513-522.

(nota 8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, pp. 245-249.

(nota 9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS, MMS, *Mutation Res.*, 278, pp. 83-98.

(nota 10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 153-159.

(nota 11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirch-Volders, M., Oleson, Jr., F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S., and Vannier, B. (1994), in vivo, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, pp. 293-304.

(nota 12) Higashikuni, N., and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30(mais ou menos) 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, pp. 313-319.

(nota 13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J., and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in in vivo Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.

- (nota 14) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, pp. 241-247.
- (nota 15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, pp. 269-275.
- (nota 16) Romagna, F., and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 213, pp. 91-104.
- (nota 17) Collapudi, B., and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, pp. 97-99.
- (nota 18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G., and Henderson, L. (1990), In Vivo Cytogenetics Assay, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part I*, revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (nota 19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G., and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

ANEXO VII

B.13/14 Mutagenicidade - Ensaio de mutação reversa em bactérias

1 Método

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 471 - Ensaio de mutação reversa bacteriana (1997).

1.1 Introdução

O ensaio de mutação reversa bacteriana utiliza estirpes de *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* carentes em aminoácidos para detectar mutações pontuais, causadas pela substituição, adição ou supressão de um ou mais pares de bases do ADN (ver nota 1) (ver nota 2) (ver nota 3). O princípio do presente ensaio de mutação reversa bacteriana é a detecção de mutações que invertem as mutações existentes nas estirpes de ensaio, restaurando a capacidade funcional das bactérias sintetizarem um ácido essencial. As bactérias com mutação reversa são detectadas pela sua capacidade de crescimento na ausência do aminoácido em que as estirpes de ensaio eram carentes.

As mutações pontuais causam diversas doenças genéticas humanas, existindo provas substanciais de que as mutações pontuais em oncogenes e em genes supressores de tumores nas células somáticas estão envolvidas na formação de tumores nos seres humanos e em animais experimentais. O ensaio de mutação reversa bacteriana é rápido, barato e relativamente fácil de execução. Muitas das estirpes de ensaio têm diversas características que as tornam mais sensíveis para a detecção de mutações, nomeadamente sequências de ADN identificativas dos locais de inversão, aumento da permeabilidade celular a grandes moléculas e eliminação ou aumento da ocorrência de erros nos processos de reparação do ADN. A especificidade das estirpes de ensaio pode fornecer alguma informação útil sobre os tipos de mutações induzidos pelos agentes genotóxicos. Já existe uma grande base de dados com resultados respeitantes a uma vasta gama de ensaios de mutação reversa bacteriana, tendo sido desenvolvidas metodologias com características bem conhecidas e que utilizam produtos químicos com diferentes propriedades físico-químicas, nomeadamente compostos temporários.

V. também a parte B da introdução geral.

1.2 Definições

Ensaio de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* ou *Escherichia coli*: detecta mutações em estirpes carentes num determinado aminoácido (histidina ou triptofano, respectivamente), que tem como resultado a produção de uma estirpe independente do abastecimento externo desse aminoácido.

Mutagénicos de substituição de um par de base: são os agentes que causam uma alteração das bases do ADN. No ensaio de mutação reversa essa alteração pode ocorrer no local da mutação original ou num local diferente do genoma bacteriano.

Mutagénicos por deslocação do quadro de leitura: são agentes que causam a adição ou supressão de um ou mais pares de bases no ADN, modificando dessa forma o quadro de leitura do ARN.

1.3 Considerações iniciais

O ensaio de mutação reversa bacteriana utiliza células procariotas, que diferem das células de mamífero em características como a absorção, metabolismo, estrutura dos cromossomas e processos de reparação do ADN. Os ensaios conduzidos *in vitro* exigem geralmente a utilização de uma fonte exógena de activação metabólica. Os sistemas de activação metabólica *in vitro* não reproduzem inteiramente as condições *in vivo* nos mamíferos. O ensaio não fornece, por conseguinte, informação directa sobre a potência mutagénica e carcinogénica da substância nos mamíferos.

O ensaio de mutação reversa bacteriana é geralmente utilizado para a despistagem inicial da actividade genotóxica e, nomeadamente, para detectar a indução de mutações pontuais. Uma extensa base de dados demonstrou que muitos produtos químicos que dão resultados positivos no presente ensaio apresentam uma actividade mutagénica noutros ensaios. Há exemplos de agentes mutagénicos que não são detectados pelo presente ensaio, podendo as razões para essas falhas ser atribuídas à natureza específica do ponto final detectado, a diferenças na activação metabólica ou ainda a diferenças na biodisponibilidade. Por outro lado, elementos que aumentem a sensibilidade do ensaio de mutação reversa bacteriana podem conduzir à sobrestimação da actividade mutagénica.

O ensaio de mutação reversa bacteriana pode não ser apropriado para a avaliação de certas classes de produtos químicos, nomeadamente compostos altamente bactericidas (por exemplo: certos antibióticos) e produtos que se pensa (ou que se sabe) que interferem especificamente com o sistema de replicação das células de mamíferos (por exemplo: alguns inibidores da topoisomerase e alguns compostos análogos a nucleosídeos). Nesses casos, poderá ser mais apropriado utilizar ensaios de mutação em células de mamíferos.

Embora muitos dos compostos que dão resultados positivos no presente ensaio sejam carcinogénicos para os mamíferos, essa correlação não é absoluta. Com efeito, a correlação depende da classe química e, por outro lado, alguns agentes carcinogénicos não são detectados no ensaio pelo facto de o seu mecanismo ou mecanismos de actuação, não genotóxicos, não afectar(em) as células bacterianas.

1.4 Princípio do método de ensaio

As suspensões bacterianas são expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólico exógeno. No método de incorporação em placas, as suspensões são misturadas num revestimento de gelose e depois vertidas na superfície de uma lâmina de gelose com meio mínimo. No método com incubação prévia, a mistura de tratamento é incubada e só depois misturada com uma cobertura de gelose e preparada em placas com meio mínimo. Independentemente da técnica que tenha sido utilizada, as colónias com mutação reversa são contadas e comparadas com o número de colónias com mutação reversa espontânea em placas de controlo com solvente, após dois ou três dias de incubação.

Estão descritos diversos procedimentos para executar o ensaio de mutação reversa bacteriana. Entre os mais geralmente utilizados estão o método de incorporação em placas (ver nota 1) (ver nota 2) (ver nota 3) (ver nota 4), o método com incubação prévia (ver nota 2) (ver nota 3) (ver nota 5) (ver nota 6) (ver nota 7) (ver nota 8), o método em flutuação (ver nota 9) (ver nota 10) e o método em suspensão (ver nota 11). As adaptações necessárias para os ensaios de gases ou vapores também se encontram descritas (ver nota 12).

Os procedimentos descritos no presente método dizem principalmente respeito aos métodos de incorporação em placas e com incubação prévia. Qualquer dos dois é aceitável para a realização de experiências na presença e na ausência de um sistema de activação metabólica. Algumas substâncias poderão ser detectadas de forma mais eficaz utilizando o método com incubação prévia. Essas substâncias pertencem a classes químicas que incluem as nitrosaminas alifáticas de cadeia curta, os metais, os aldeídos, os corantes azóicos e compostos diazóicos, os alcalóides de priolizidina, os compostos alílicos e os compostos nitro (ver nota 3). Por outro lado, certas classes de mutagêneos nem sempre são detectadas quando se utilizam os procedimentos padrão, tais como o método de incorporação em placas ou o método com incubação prévia. Esses casos são considerados «especiais» e recomenda-se fortemente que sejam utilizados procedimentos alternativos para a sua detecção. Estão já identificados os seguintes casos «especiais» (e exemplos dos procedimentos que podem ser utilizados para a sua detecção): corantes azóicos e compostos diazóicos (ver nota 3) (ver nota 5) (ver nota 6) (ver nota 13), gases e compostos químicos (ver nota 12) (ver nota 14) (ver nota 15) (ver nota 16) e glicósidos (ver nota 17) (ver nota 18) voláteis. Qualquer desvio do procedimento padrão terá de ser cientificamente justificado.

1.5 Descrição do método de ensaio

1.5.1 Preparação

1.5.1.1 Bactérias

Devem ser utilizadas culturas frescas de bactérias na fase final do crescimento exponencial ou no início da fase estacionária (aproximadamente 10^8 células/ml). Não devem ser utilizadas culturas em fase estacionária adiantada. É essencial que as culturas utilizadas na experiência contenham um título elevado de células viáveis, que pode ser demonstrado por dados históricos de controlo sobre as curvas de crescimento ou durante o próprio ensaio, através da determinação das células viáveis em placas.

A temperatura de incubação recomendada é 37°C.

Devem ser utilizadas pelo menos cinco estirpes das bactérias, entre as quais quatro estirpes de *S. typhimurium* (TA1535; TA1537 ou TA97 ou TA97a; TA98, e TA100) para as quais foi demonstrado que são fiáveis e dão resultados reprodutíveis entre laboratórios. Essas quatro estirpes de *S. typhimurium* têm um par com as bases GC no local da inversão primária e sabe-se que não permitem detectar certos agentes mutagêneos oxidantes, de ligação cruzada nem hidrazinas. Essas substâncias podem ser detectadas utilizando as estirpes *E. coli* WP2 ou *S. typhimurium* TA102 (ver nota 19) que têm um par com as bases AT no local da inversão primária. Por conseguinte, a combinação de estirpes recomendada é:

- *S. typhimurium* TA1535; e
- *S. typhimurium* TA1537 ou TA97 ou TA97a; e
- *S. typhimurium* TA98; e
- *S. typhimurium* TA100; e
- *E. coli* WP2 uvrA, ou *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), ou *S. typhimurium* TA102.

Para a detecção de agentes mutagêneos causadores de ligações cruzadas poderá ser preferível incluir a estirpe TA102 ou acrescentar uma estirpe capaz de reparar o ADN de *E. coli* [por exemplo: *E. coli* WP2 ou *E. coli* WP2 (pKM101)].

Devem ser utilizados os procedimentos estabelecidos para a preparação de culturas de arranque, verificação dos mercadores e armazenamento. As quantidades de aminoácidos

necessários para o crescimento (histidina para as estirpes de *S. typhimurium* e triptofano para as estirpes de *E. coli*) devem ser demonstradas para cada preparação de cultura de arranque conservada. Outras características fenotípicas devem também ser verificadas, a saber: a presença ou ausência de plasmídeos de Factor-r, quando necessário [ou seja, resistência à ampicilina nas estirpes TA98, TA100 e TA97 ou TA97a, WP2 uvrA e WP2 uvrA (pKM101) e resistência à ampicilina e à tetraciclina na estirpe TA102]; presença de mutações características (ou seja, mutação rfa em *S. typhimurium*, através da sensibilização com violeta de cristal, e mutação uvrA em *E. coli* ou mutação uvrB em *S. typhimurium*, através da sensibilização com raios ultravioleta) (ver nota 2) (ver nota 3). As estirpes devem ainda apresentar, de forma espontânea, contagens de mutações reversas nas gamas de frequência esperadas em função dos dados históricos de controlo do laboratório e também, de preferência, da literatura.

1.5.1.2 Meio

Será utilizado um meio mínimo de gelose apropriado (por exemplo: contendo meio mínimo Vogel-Bonner E. e glucose) e uma cobertura de gelose com histidina e biotina ou triptofano para permitir alguma divisão celular (ver nota 1) (ver nota 2) (ver nota 9).

1.5.1.3 Activação metabólica

As bactérias devem ser expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema adequado de activação metabólica. O sistema mais geralmente utilizado é uma fracção pós-mitocondrial reforçada com co-factor (S9) preparada a partir de fígados de roedores tratados com agentes de indução enzimática, como por exemplo Aroclor 1254 (ver nota 1) (ver nota 2) ou uma mistura de fenobarbitona e (beta)-naftoflavona (ver nota 18) (ver nota 20) (ver nota 21). A fracção pós-mitocondrial é geralmente utilizada em concentrações na gama de 5% a 30% v/v na mistura S9. A escolha e o estado do sistema de activação metabólico podem depender da classe dos produtos químicos em estudo. Em alguns casos pode revelar-se adequado utilizar várias concentrações diferentes de fracção pós-mitocondrial. Para os corantes azóicos, para os compostos diazóicos, poderá ser mais indicado um sistema de activação metabólica redutor (ver nota 6) (ver nota 13).

1.5.1.4 Substância em estudo/preparação

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes da exposição das bactérias. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, devendo ser compatível com a sobrevivência das células e com a actividade da mistura S9. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de solventes/veículos aquosos. Quando forem realizados ensaios de substâncias instáveis na presença de água, os solventes orgânicos utilizados devem ser anidros.

1.5.2 Condições do ensaio

1.5.2.1 Estirpes (v. 1.5.1.1)

1.5.2.2 Concentração de exposição

A citotoxicidade e a solubilidade na mistura final constituem alguns dos critérios a ter em conta na determinação da maior quantidade da substância em estudo a utilizar.

Poderá ser útil determinar a toxicidade e insolubilidade através de uma experiência preliminar. A citotoxicidade pode ser detectada pela redução do número de colónias com mutação reversa, pela presença de colónias mais claras ou de menores dimensões ou pelo grau de sobrevivência das culturas expostas. A citotoxicidade de uma substância pode variar na

presença de sistemas de activação metabólicos. A insolubilidade deve ser avaliada em função da precipitação verificável a olho nu na mistura final nas condições reais do ensaio.

A concentração máxima de ensaio recomendada para substâncias solúveis não citotóxicas é de 5 mg/placa ou de 5 (mi)l/placa. Para as substâncias não citotóxicas insolúveis a 5 mg/placa ou a 5 (mi)l/placa, uma ou mais das concentrações ensaiadas devem ser insolúveis na mistura final. As substâncias de ensaio citotóxicas abaixo dos 5 mg/placa ou 5 (mi)l/placa devem ser ensaiadas até uma concentração citotóxica. O precipitado não deve interferir com a contagem. Numa experiência inicial devem ser utilizadas pelo menos cinco concentrações analisáveis diferentes da substância em estudo, com intervalos aproximadamente semilogarítmicos (ou seja, (ver fórmula no documento original)) entre as concentrações. Para a investigação da relação concentração-resposta poderão ser indicados intervalos menores. Poderá ser contemplada a possibilidade de ensaiar concentrações superiores a 5 mg/placa ou 5 (mi)l/placa, quando se pretender avaliar substâncias que contenham quantidades substanciais de impurezas potencialmente mutagénicas.

1.5.2.3 Controlos negativos e positivos

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente ou veículo) específicos para cada estirpe, devendo, para os controlos positivos, ser escolhidas concentrações que demonstrem o desempenho eficaz de cada ensaio.

Para os ensaios com utilização de um sistema de activação metabólica, a substância de referência para os controlos positivos deve ser seleccionada com base no tipo de estirpe de bactéria utilizada.

As seguintes substâncias são exemplos de controlos positivos apropriados para os ensaios com activação metabólica:

(ver quadro no documento original)

A seguinte substância é um controlo positivo apropriado para o método de activação metabólico redutor:

(ver quadro no documento original)

O 2-aminoantraceno não deve ser utilizado como único indicador da eficácia da mistura S9. Se essa substância for utilizada, cada lote S9 deve ser igualmente caracterizado com um agente mutagénico que exija activação metabólica por enzimas microssómicos, como, por exemplo, o benzo[a]pireno ou o dimetilbenzo[a]antraceno.

As seguintes substâncias são exemplos de controlos positivos específicos apropriados para cada estirpe, adequados para os ensaios sem utilização de um sistema exógeno de activação metabólica:

(ver quadro no documento original)

Podem utilizar-se no controlo positivo outras substâncias adequadas. A possibilidade de utilização de produtos químicos de uma classe afim para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam.

Devem também realizar-se controlos negativos, consistindo apenas em solvente ou veículo e sem a substância em estudo, que serão sujeitos exactamente ao mesmo procedimento que os grupos expostos. Além disso, devem igualmente ser utilizados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que existam dados históricos de controlo que demonstrem que o solvente escolhido não induz qualquer efeito deletério ou mutagénico.

1.5.3 Procedimento

Para o método de incorporação em placas (ver nota 1) (ver nota 2) (ver nota 3) (ver nota 4) sem activação metabólica, utilizam-se geralmente 0,05 ml ou 0,1 ml da solução de ensaio, 0,1 ml de cultura bacteriana fresca (aproximadamente 10⁸ (elevado a 8) células viáveis) e 0,5 ml de tampão estéril, que são misturados com 2,0 ml de gelose de cobertura. Para o ensaio com activação metabólica utilizam-se geralmente 0,5 ml de mistura de activação metabólica, que contém uma quantidade adequada de fracção pós-mitocondrial (entre 5% a 30% v/v na

mistura de activação metabólica), misturada com a gelose de cobertura (2,0 ml), as bactérias e a substância em estudo/solução de ensaio. O conteúdo de cada tubo é misturado e deitado sobre uma placa de meio mínimo de gelose. A gelose de cobertura deve solidificar antes da incubação.

No método com incubação prévia (ver nota 2) (ver nota 3) (ver nota 5) (ver nota 6), a substância em estudo/solução de ensaio é previamente incubada com a estirpe de ensaio (aproximadamente 10^8 células viáveis) e o tampão estéril ou o sistema de activação metabólica (0,5 ml), geralmente durante 20 minutos ou mais a 30°C-37°C, antes de ser misturada com a gelose de cobertura e deitada sobre uma placa com meio mínimo de gelose. Normalmente, são utilizados 0,05 ml ou 0,1 ml da substância em estudo/solução de ensaio, 0,1 ml de cultura bacteriana e 0,5 ml da mistura S9 ou de tampão estéril, misturados com 2,0 ml de gelose de cobertura. Os tubos devem ser arejados durante a pré-incubação, utilizando o agitador.

Para uma avaliação adequada da variação devem ser utilizadas placas em triplicado para cada dose. A utilização de placas em duplicado é aceitável desde que seja justificada cientificamente. A perda ocasional de uma placa não invalida necessariamente o ensaio.

As substâncias gasosas ou voláteis devem ser ensaiadas por métodos apropriados, por exemplo em recipientes selados (ver nota 12) (ver nota 14) (ver nota 15) (ver nota 16).

1.5.4 Incubação

Todas as placas de cada ensaio devem ser incubadas a 37°C durante 48-72 horas. Após a incubação, contam-se as colónias com mutação reversa em cada placa.

2 Dados

2.1 Tratamento dos resultados

Os dados devem ser apresentados sob a forma do número de colónias com mutação reversa por placa. O número de colónias com mutação reversa nas placas de controlo negativas (controlo do solvente e, se tiver sido utilizado, controlo não exposto) e positivas deve também ser apresentado. As contagens individuais das placas, o número médio de colónias com mutação reversa por placa e o respectivo desvio padrão devem ser apresentados para a substância em estudo e para os controlos positivos e negativos (não expostos à substância em estudo e ou solvente).

Não há nenhuma exigência concreta para a verificação de uma resposta positiva clara. Os resultados ambíguos devem ser melhor esclarecidos, de preferência com modificação das condições experimentais. Os resultados negativos têm de ser confirmados caso a caso. Nos casos em que a confirmação dos resultados negativos não seja considerada necessária, deve ser apresentada uma justificação. Para a realização de experiências adicionais, deve ser analisada a possibilidade de modificação dos parâmetros do estudo, por forma a aumentar a gama de condições avaliadas. Os parâmetros que podem eventualmente ser alterados incluem a gama de concentrações, o método de tratamento (incorporação em placas ou pré-incubação em meio líquido) e as condições de activação metabólica.

2.2 Avaliação e interpretação dos resultados

Há diversos critérios para determinar um resultado positivo, tais como um aumento do número de colónias por placa com mutação reversa em pelo menos uma estirpe, com ou sem sistema de activação metabólico, que esteja relacionado com a concentração na gama ensaiada e ou que seja reprodutível numa ou mais das concentrações ensaiadas (ver nota 23). Deve ser tomada em consideração, antes de mais, a importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios poderão ser utilizados métodos estatísticos (ver nota 24). Contudo, a significância estatística não deve ser o único elemento de determinação para uma resposta positiva.

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios acima indicados no presente ensaio é considerada não mutagénica.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos, independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio de mutação reversa bacteriana indica que a substância induz mutações pontuais por substituição das bases ou por deslocação do quadro de leitura no genoma de *Salmonella typhimurium* e ou *Escherichia coli*. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância não é mutagénica para as espécies ensaiadas.

3 Apresentação de relatórios

Relatório de ensaio

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

- justificação para a escolha do solvente/veículo;
- solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/veículo, se conhecida.

Estirpes:

- estirpes usadas;
- número de células por cultura;
- características da estirpe.

Condições de ensaio:

- quantidade da substância em estudo por placa (mg/placa ou ml/placa), com justificação da escolha da dose e do número de placas preparadas por concentração;
- meios utilizados;
- tipo e composição do sistema de activação metabólica, incluindo critérios de aceitabilidade;
- protocolo do tratamento.

Resultados:

- sinais de toxicidade;
- sinais de precipitação;
- contagens individuais das placas;
- número médio de colónias com mutação reversa por placa e respectivo desvio padrão;
- relação dose-resposta, quando seja possível de determinar;
- análise estatística, quando tenha sido realizada;
- dados relativos aos controlos negativo (solvente/veículo) e positivo realizados em paralelo com o ensaio, com as respectivas gamas, valores médios e desvios padrão;
- dados históricos relativos aos controlos negativo (solvente/veículo) e positivo realizados em paralelo com o ensaio, com as respectivas gamas, valores médios e desvios padrão.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4 Bibliografia

(nota 1) Ames, B. N., McCann, J., and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.

(nota 2) Maron, D. M., and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.

(nota 3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T. Venitt, S., and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217-233.

(nota 4) Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K., and Ray, V. (1986),

The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 168, pp. 69-240.

(nota 5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T., and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, 1, pp. 91-96.

(nota 6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Norpoth, K. H., and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.

(nota 7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D., and Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

(nota 8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U., and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, pp. 167-177.

(nota 9) Green, M. H. L., Muriel, W. J., and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations Res.*, 38, pp. 33-42.

(nota 10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D., and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W., and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

(nota 11) Thompson, E. D., and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453-465.

(nota 12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F., and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Caseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, pp. 335-344.

(nota 13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D., and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzdine and Benzdine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified *Salmonella* Assay, *Mutation Res.*, 136, pp. 33-47.

(nota 14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T., and Mortelmans, K. (1992), *Salmonella* Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2-141.

(nota 15) Simmon, V., Kauhanen, K., and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

(nota 16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G., and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/*Salmonella* Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421-441.

(nota 17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, pp. 3780-3782.

(nota 18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A., and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77, pp. 4961-4965.

(nota 19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J., and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285-291.

(nota 20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K., and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in:

In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

(nota 21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M., and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254 - induced S9 in: in vitro Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7 pp. 175-177.

(nota 22) Maron, D., Katzenellenbogen, J., and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, Mutation Res., 88, pp. 343-350.

(nota 23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E., and Zeiger, E. (1987), Guide for the Salmonella typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation Res., 189, pp. 83-91.

(nota 24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D., and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

ANEXO VIII

B.17 Mutagenicidade - Ensaio de mutação génica em células de mamíferos in vitro

1 Método

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 476 - Ensaio de mutação génica de mamíferos in vitro (1997).

1.1 Introdução

O ensaio de mutação génica em células de mamíferos in vitro pode ser utilizado para detectar mutações génicas induzidas por substâncias químicas. As linhas celulares que podem ser utilizadas incluem as células L5178U do linfoma do rato, as linhas celulares CHO, CHO-AS52 e V79 do hamster chinês e as células linfoblastóides humanas TK6 (ver nota 1). Nessas linhas celulares, os pontos finais genéticos mais utilizados são as mutações da timidina quinase (TK), da hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HPRT) e do transgene de xantina-guanina fosforibosil transferase (XPRT). Os ensaios de mutação TK, HPRT e XPRT detectam diferentes gamas de ocorrências genéticas. A localização autossómica das mutações TK e XPRT pode permitir a detecção de ocorrências genéticas (por exemplo: supressão de grandes sequências) que não são detectadas no locus HPRT nos cromossomas X (ver nota 2) (ver nota 3) (ver nota 4) (ver nota 6).

No ensaio de mutação génica em células de mamíferos in vitro podem ser utilizadas culturas de qualquer linha celular ou estirpe de características bem conhecidas. As células utilizadas são seleccionadas com base na sua capacidade de desenvolvimento em cultura e na estabilidade da frequência das mutações espontâneas.

Os ensaios realizados in vitro exigem geralmente a utilização de uma fonte exógena de activação metabólica. Os sistemas de activação metabólicos in vitro não reproduzem inteiramente as condições in vivo nos mamíferos. Devem portanto ser evitadas condições que conduzam a resultados que não reflectem uma mutagenicidade intrínseca. Os eventuais resultados positivos não resultantes de mutagenicidade intrínseca podem ser causados por alterações do pH, da pressão osmótica ou por níveis elevados de citotoxicidade (ver nota 7).

O presente ensaio é utilizado para o controlo de eventuais agentes mutagénicos e carcinogénicos em mamíferos. Embora muitos dos compostos que dão resultados positivos no presente ensaio sejam carcinogénicos para os mamíferos, essa correlação não é absoluta. Com efeito, a correlação depende da classe química e, por outro lado, há cada vez mais dados que provam que alguns agentes carcinogénicos não são detectados no ensaio porque parecem actuar através de mecanismos não genotóxicos ou através de mecanismos ausentes nas células bacterianas (ver nota 6).

V. também a parte B da introdução geral.

1.2 Definições

Mutação para diante: mutação genética do tipo parental para a forma mutante que causa uma alteração ou perda de actividade enzimática da função da proteína codificada.

Mutagêneos por substituição de um par de bases: substâncias que causam a substituição de um ou vários pares de bases do ADN.

Mutagêneos por deslocação do quadro de leitura: substâncias que causam a adição ou supressão de um par de bases ou de uma sequência de pares de bases do ADN.

Período de expressão fenotípica: período que decorre até que os produtos dos genes inalterados se esgotem nas células recentemente sujeitas a uma mutação.

Frequência de mutação: relação entre o número de células mutantes observadas e o número de células viáveis.

Crescimento total relativo: aumento no número de células por unidade de tempo, por comparação com uma população de controlo, calculado como o produto da relação entre o crescimento em suspensão e no controlo negativo com a relação entre a eficiência de clonagem em suspensão e no controlo negativo.

Crescimento relativo em suspensão: relação entre o aumento no número de células durante o período de expressão em suspensão e no controlo negativo.

Viabilidade: eficiência de clonagem das células expostas incubadas em placas, após o período de expressão, sob condições selectivas.

Sobrevivência: eficiência de clonagem das células expostas incubadas em placas no fim do período de exposição; a sobrevivência é geralmente expressa em relação à sobrevivência da população celular de controlo.

1.3 Princípio do método de ensaio

As células deficientes em timidina quinase (TK) devido à mutação (ver fórmula no documento original) são resistentes aos efeitos citotóxicos do análogo de pirimidina da trifluorotimidina (TFT). As células que dispõem de timidina quinase são sensíveis ao TFT, que causa inibição do metabolismo celular e impede a divisão da célula. Logo, as células mutantes podem proliferar na presença de TFT, o que não acontece com as células normais, com timidina quinase. Da mesma forma, as células carentes em HPRT ou XPRT são seleccionadas pela resistência à 6-tioguanina (TG) ou à 8-azaguanina (AG). As propriedades da substância em estudo devem ser cuidadosamente tomadas em consideração se o ensaio de mutação génica em células de mamíferos for utilizado para ensaiar uma substância análoga das bases ou um composto relacionado com o agente selectivo. Assim, por exemplo, deve ser investigada qualquer suspeita de toxicidade selectiva da substância em estudo para as células mutantes e não mutantes. Logo, o desempenho do sistema/agente selectivo deve ser confirmado quando se ensaiarem produtos químicos estruturalmente relacionados com o agente selectivo (ver nota 8).

As células em suspensão ou em cultura em monocamada são expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica durante um período de tempo apropriado, sendo depois cultivadas para determinar a citotoxicidade e para permitir a expressão fenotípica antes de seleccionar o mutante (ver nota 9) (ver nota 10) (ver nota 11) (ver nota 12) (ver nota 13). A citotoxicidade é geralmente determinada através da medição da eficiência relativa de clonagem (sobrevivência) ou do crescimento total relativo das culturas após o período de exposição. As culturas expostas são mantidas em meio de crescimento durante um período de tempo suficiente, que varia em função do locus seleccionado e do tipo de célula, por forma a permitir uma expressão fenotípica tão boa quanto possível das mutações induzidas. A frequência de mutação é determinada inoculando um número conhecido de células num meio com agente selectivo para as células mutantes e num meio sem agente selectivo para determinação das respectivas eficiências de clonagem (viabilidade). Após um período de incubação apropriado, as colónias são contadas. A

frequência de mutação é calculada a partir do número de colónias mutantes no meio selectivo e do número de colónias no meio não selectivo.

1.4 Descrição do método de ensaio

1.4.1 Preparação

1.4.1.1 Células

O presente ensaio pode ser realizado com diversos tipos de células, nomeadamente subclones das células L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 ou TK6. Os tipos de célula utilizados no presente ensaio devem ter uma sensibilidade demonstrada a mutagénicos químicos, uma eficiência de clonagem elevada e uma frequência de mutação espontânea estável. As células devem ser verificadas para detectar eventuais contaminações por microplasma, não devendo ser utilizadas se estiverem contaminadas.

O ensaio deve ser concebido para ter uma determinada sensibilidade e definição. O número de células e de culturas e as concentrações da substância em estudo a utilizar serão reflexo dos parâmetros definidos (ver nota 14). O número mínimo de células viáveis que devem sobreviver à exposição e ser utilizadas em cada fase do ensaio deve basear-se na frequência da mutação espontânea. A título indicativo, deve ser utilizado um número de células pelo menos 10 vezes superior ao inverso da frequência de mutação espontânea, com um mínimo recomendado de 10 (elevado a 6) células. Para verificação da consistência do desempenho do ensaio, devem estar disponíveis dados históricos adequados sobre o sistema celular utilizado.

1.4.1.2 Meios e condições de cultura

Devem ser utilizados meios de cultura e condições de incubação (recipientes, temperatura, CO₂ (índice 2), concentração e humidade) apropriados. Os meios devem ser escolhidos de acordo com o sistema selectivo e com o tipo de células utilizados no ensaio. É particularmente importante que sejam escolhidas condições de cultura que garantam o crescimento óptimo das células durante o período de expressão e a capacidade de formação de colónia por parte das células mutantes e não mutantes.

1.4.1.3 Preparação das culturas

As células são propagadas a partir de culturas de arranque, inoculadas no meio de cultura e incubadas a 37°C. Antes da realização no presente ensaio, as culturas poderão ter de ser limpas de células mutantes eventualmente presentes.

1.4.1.4 Activação metabólica

As bactérias devem ser expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema adequado de activação metabólica. O sistema geralmente mais utilizado é uma fracção pós-mitocondrial reforçada com co-factor (S9) preparada a partir de fígados de roedores tratados com agentes de indução enzimática, como por exemplo Aroclor 1254 (ver nota 15) (ver nota 16) (ver nota 17) (ver nota 18) ou uma mistura de fenobarbitona e (beta)-naftoflavona (ver nota 19) (ver nota 20).

A fracção pós-mitocondrial é geralmente utilizada em concentrações na gama de 1%-10% v/v no meio de ensaio final. A escolha e estado do sistema de activação metabólico podem depender da classe do produto químico em estudo. Em alguns casos, poderá ser apropriado utilizar mais de uma concentração de fracção pós-mitocondrial.

Alguns desenvolvimentos, nomeadamente a produção por engenharia genética de linhas celulares que expressem enzimas de activação específicas, podem ter algum potencial em termos de activação endógena. A escolha das linhas celulares utilizadas deve ser cientificamente justificada (por exemplo: pela importância da isoenzima do citocromo P450 para o metabolismo da substância em estudo).

1.4.1.5 Substância em estudo/preparação

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes da exposição das células. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e ou diluídas antes de serem

adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2 Condições de ensaio

1.4.2.1 Solvente/veículo

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, devendo ser compatível com a sobrevivência das células e com a actividade da mistura S9. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de solventes/veículos aquosos. Quando forem realizados ensaios de substâncias instáveis na presença de água, os solventes orgânicos utilizados devem ser anidros. A água poderá ser removida através de um filtro molecular.

1.4.2.2 Concentrações de exposição

A citotoxicidade, a solubilidade no sistema de ensaio e as alterações do pH ou da pressão osmótica constituem alguns dos critérios a ter em conta na determinação de concentração máxima.

A citotoxicidade deve ser determinada tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica na experiência principal, utilizando um indicador apropriado da integridade e crescimento das células, tal como a eficiência relativa de clonagem (sobrevivência) ou o crescimento relativo total. Poderá ser útil determinar a toxicidade e insolubilidade através de uma experiência preliminar.

Devem ser utilizadas pelo menos quatro concentrações analisáveis. Quando existir citotoxicidade, essas concentrações devem abranger uma gama de toxicidade que varie da toxicidade máxima a quase nula: o que significa geralmente que as concentrações devem variar num factor de 2 a (ver fórmula no documento original). Se a concentração máxima for definida por razões de citotoxicidade, a sobrevivência relativa (eficiência relativa de clonagem) ou o crescimento relativo total devem ser da ordem dos 10%-20% (mas não inferiores a 10%). Para as substâncias com citotoxicidade relativamente baixa, a concentração máxima do ensaio deve ser a mais baixa de 5 mg/ml, 5 (µg)/ml ou 0,01 M.

Para substâncias relativamente insolúveis a dose máxima a utilizar deve ser igual ou superior ao limite de solubilidade nas condições de cultura. A insolubilidade no meio final a que as células são expostas deve ser demonstrada. Poderá ser útil avaliar a solubilidade no início e no fim do tratamento, uma vez que a mesma se pode alterar durante a exposição no sistema de ensaio devido à presença de células, de S9, de soro, etc. A insolubilidade pode ser detectada à vista desarmada. O precipitado não deve interferir com as contagens necessárias.

1.4.2.3 Controlos negativos e positivos

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo), tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica. Quando for utilizada activação metabólica, o produto químico de controlo positivo deve ser o mesmo que exige activação para dar uma resposta mutagénica.

As substâncias de controlo positivo podem ser, por exemplo:
(ver quadro no documento original)

Podem ser utilizadas outras substâncias de referência apropriadas para o controlo positivo. Assim, se um laboratório dispuser, por exemplo, de uma base de dados históricos sobre a utilização de 5-bromo 2'-deoxiuridina (número CAS 59-14-3, número EINECS 200-415-9), essa substância de referência poderá também ser utilizada. Quando existam, deve ser analisada a possibilidade de utilizar produtos químicos de controlo positivos de classes químicas relacionadas.

Devem também realizar-se controlos negativos, consistindo apenas em solvente ou veículo e sem a substância em estudo, que serão sujeitos exactamente ao mesmo procedimento que os

grupos expostos. Além disso, devem igualmente ser utilizados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que existam dados históricos de controlo que demonstrem que o solvente escolhido não induz qualquer efeito deletério ou mutagénico.

1.4.3 Procedimento

1.4.3.1 Exposição à substância em estudo

As células em proliferação devem ser expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica durante um período de tempo apropriado (3 a 6 horas é geralmente eficaz). O período de exposição pode ser alargado a um ou mais ciclos celulares.

Para cada concentração a ensaiar podem ser utilizadas culturas expostas únicas ou em duplicado. Quando forem utilizadas culturas únicas, o número de concentrações deve ser aumentado, por forma a garantir um número de culturas adequado para a análise (por exemplo: pelo menos oito concentrações analisáveis). Devem também ser incluídas culturas de controlo negativas (solventes) duplicadas.

As substâncias gasosas ou voláteis devem ser ensaiadas por métodos apropriados, por exemplo em recipientes selados (ver nota 21) (ver nota 22).

1.4.3.2 Medição da sobrevivência, viabilidade e frequência de mutação

No fim do período de exposição, as células são lavadas e cultivadas para determinar a sobrevivência e para permitir a expressão fenotípica das mutações. A medição de citotoxicidade através da determinação da eficiência relativa de clonagem (sobrevivência) ou do crescimento total relativo das culturas é geralmente iniciada após o período de exposição.

Para cada locus há um tempo mínimo definido para permitir uma expressão fenotípica quase óptima das mutações recentemente induzidas (o HPRT e o XPRT exigem pelo menos de seis a oito dias e o TK pelo menos dois dias). As células são cultivadas em meios com presença e ausência do agente selectivo para determinação, respectivamente, do número de mutações e da eficiência de clonagem. A medição da viabilidade (utilizada para calcular a frequência de mutação) é iniciada no fim do período de expressão através de cultura em placas com meio não selectivo.

Se a substância em estudo der um resultado positivo no ensaio L5178Y TK(elevado a +/-), deve ser realizada uma medição do tamanho das colónias em pelo menos uma das culturas de ensaio (a concentração máxima com resultado positivo) e nos controlos negativos e positivos. Se a substância em estudo der um resultado negativo no ensaio L5178Y(elevado a +/-), deve ser realizada uma medição do tamanho das colónias nos controlos negativos e positivos. Nos estudos que utilizem TK6TK(elevado a +/-), a medição do tamanho das colónias poderá também ser realizada.

2 Dados

2.1 Tratamento dos resultados

Os dados devem incluir a determinação de citotoxicidade e da viabilidade, para além da contagem das colónias e das frequências de mutação nas culturas expostas e nas culturas de controlo. No caso de um resultado positivo no ensaio L5178Y TK(elevado a +/-), as colónias devem ser contabilizadas utilizando o critério das colónias pequenas e grandes em pelo menos uma das concentrações da substância em estudo (a concentração máxima com resultado positivo) e nos controlos negativos e positivos. A natureza molecular e citogénica das células mutantes que formam colónias grandes e pequenas já foi investigada em pormenor (ver nota 23) (ver nota 24). No ensaio TK(elevado a +/-), as colónias devem ser contabilizadas utilizando os critérios do crescimento normal (colónias grandes) e do crescimento lento (colónias pequenas) (ver nota 25). As células mutantes que tenham sofrido danos genéticos mais extensos apresentam tempos de duplicação maiores, pelo que formam colónias mais pequenas. Esses danos variam tipicamente da perda da totalidade dos genes a aberrações cromossómicas só visíveis por análise do cariótipo. A indução de mutações que resultam no

aparecimento de colónias pequenas foi associada com produtos químicos que induzem aberrações cromossômicas graves (ver nota 26). As células menos seriamente afectadas por mutações apresentam taxas de crescimento semelhantes às células parentais e formam colónias grandes.

Deve ser apresentada a sobrevivência (eficiências relativas de clonagem) ou o crescimento total relativo. A frequência de mutação deve ser expressa como a relação entre o número de células mutantes e o número de células sobreviventes.

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

Não há nenhuma exigência concreta para a verificação de uma resposta positiva clara. Os resultados ambíguos devem ser melhor esclarecidos, de preferência com modificação das condições experimentais. Os resultados negativos têm de ser confirmados caso a caso. Nos casos em que a confirmação dos resultados negativos não seja considerada necessária, deve ser apresentada uma justificação. Para a realização de experiências adicionais, deve ser analisada a possibilidade de modificação dos parâmetros do estudo, por forma a aumentar a gama de condições avaliadas. Os parâmetros que podem eventualmente ser alterados incluem a gama de concentrações e as condições de activação metabólica.

2.2 Avaliação e interpretação dos resultados

Há diversos critérios para determinar um resultado positivo, tais como um aumento da frequência de mutação que esteja relacionado com a concentração na gama testada e ou que seja reprodutível. Deve ser tomada em consideração, antes de mais, a importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos. Contudo, a importância estatística não deve ser o único elemento de determinação para uma resposta positiva.

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios acima indicados no presente ensaio é considerada não mutagénica.

Embora a maioria das experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos, independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio de mutação génica em células de mamíferos in vitro indica que a substância induz mutações génicas nas culturas de células de mamíferos utilizadas. Uma resposta positiva à concentração que seja reprodutível é mais significativa. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância não induz mutações génicas nas culturas de células de mamífero utilizadas.

3 Apresentação de relatórios

Relatório de ensaio

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

- justificação para a escolha do veículo;
- solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/veículo, se conhecida.

Células:

- tipo e origem das células;
- número de culturas celulares;
- número de transferências, quando aplicável;
- métodos de manutenção da cultura celular, quando aplicável;
- ausência de micoplasma.

Condições de ensaio:

- justificação para a selecção das concentrações e do número de culturas, incluindo, por exemplo, dados sobre a citotoxicidade e sobre as limitações de solubilidade, quando disponíveis;
- composição dos meios, concentração de CO₂ (índice 2);
- concentração da substância em estudo;
- volumes adicionados do veículo e da substância em estudo;
- temperatura de incubação;
- tempo de incubação;
- duração de tratamento;
- densidade celular durante a exposição;
- tipo e composição do sistema de activação metabólica, incluindo critérios de aceitabilidade;
- controlos positivos e negativos;
- duração do período de expressão (incluindo o número de células inoculadas e os calendários de subcultura e de alimentação, quando aplicável);
- agentes selectivos;
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo;
- métodos utilizados para a enumeração dos números de células mutantes e viáveis;
- definição das colónias cuja dimensão e tipo são caracterizados (incluindo os critérios para a definição de colónias «pequenas» e «grandes», conforme apropriado).

Resultados:

- sinais de toxicidade;
- sinais de precipitação;
- dados sobre o pH e a pressão osmótica durante a exposição à substância de ensaio, caso tenham sido determinados;
- dimensão das colónias, caso tenha sido medida pelo menos para os controlos positivos e negativos;
- capacidade do laboratório para a detecção de pequenas colónias mutantes no sistema L5178Y TK(elevado a +/-), quando aplicável;
- relação dose-resposta, quando seja possível de determinar;
- análise estatística, quando tenha sido realizada;
- dados relativos ao controlo negativo (solvente/veículo) e positivo realizados em paralelo com o ensaio;
- dados históricos sobre o controlo negativo (solvente/veículo) e positivo, com as gamas, valores médios e desvios padrão;
- frequência das mutações.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4 Bibliografia

(nota 1) Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J., and Tindall, K. R. (eds.) (1987), Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(nota 2) Chu, E. H. Y., and Mallng, H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells In Vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, pp. 1306-1312.

(nota 3) Liber, H. L., and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, Mutation Res., 94, pp. 467-485.

(nota 4) Moore, M. M., Harington-Brock, K., Doerr, C. L., and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, Mutagenesis, 4, pp. 394-403.

- (nota 5) Aaron, C. S., and Stankowski, Jr., L. F. (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res.*, 213, pp. 121-128.
- (nota 6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr., L. F., Theiss, J., and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures, *Mutation Res.*, 312, pp. 235-239.
- (nota 7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J., and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147-204.
- (nota 8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C., and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 115, pp. 225-251.
- (nota 9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H., and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U. S. Environment Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 196, pp. 17-36.
- (nota 10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr., and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Ce(mi)l/Hypoxanthine-Cuanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 135-141.
- (nota 11) Liber, H. L., Yandell, D. W., and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.*, 116, pp. 9-17.
- (nota 12) Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R., and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate - and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate - and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*, 160, pp. 133-147.
- (nota 13) Turner, N. T., Batson, A. G., and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/TK(elevado a +/-) - TK(elevado a +/-) Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.
- (nota 14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B., and Asquith, J. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (nota 15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N., and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutarns in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.*, 46, pp. 365-373.
- (nota 16) Ames, B. N., McCann, J., and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (nota 17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G., and Brown, M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK(elevado a +/-) Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutation Res.*, 59, pp. 61-108.
- (nota 18) Maron, D. M., and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (nota 19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcome, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M., and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in: *In Vitro Genotoxicity Assays*, Mutagenesis, 7, pp. 175-177.

- (nota 20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K., and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R., and Philpot, R. M. (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (nota 21) Krahn, D. F., Barsky, F. C., and McCooley, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds.), Genotoxic Effects of Airborne Agents, New York, Plenum, pp. 91-103.
- (nota 22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P., and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, Environmental Mutagenesis, 5, pp. 795-801.
- (nota 23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A., and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87, pp. 51-55.
- (nota 24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T., and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT) and Mutants of L5178Y/TK(elevado a +/-) Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 151, pp. 161-174.
- (nota 25) Yandell, D. W., Dryja, T. P., and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, Mutation Res., 229, pp. 89-102.
- (nota 26) Moore, M. M., and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK(elevado a +/-) - 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, Mutagenesis, 5, pp. 609-614.

ANEXO IX

B.23 Ensaio de aberrações cromossómicas em espermatogónias de mamífero

1 Método

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 483 - Ensaio de aberração cromossómica em espermatogónias de mamífero (1997).

1.1 Introdução

O objectivo do ensaio in vivo de aberrações cromossómicas em espermatogónias de mamífero é identificar as substâncias que causam aberrações cromossómicas estruturais nas células espermatogónias de mamífero (ver nota 1) (ver nota 2) (ver nota 3) (ver nota 4) (ver nota 5). As aberrações estruturais podem ser de dois tipos: cromossómicas ou cromatídicas. A maior parte dos mutagénicos químicos induzem aberrações cromatídicas, mas também podem ocorrer aberrações cromossómicas. O método não foi concebido para medir aberrações numéricas e não é normalmente utilizado com esse objectivo. As mutações cromossómicas e eventos relacionados causam diversas doenças genéticas humanas.

O presente ensaio mede eventos a nível dos cromossomas de células germinais espermatogónias e, por conseguinte, pressupõe-se que tenha um carácter de previsão da indução de mutações transmissíveis nas células germinais.

No presente ensaio utilizam-se normalmente roedores. O ensaio citogénico in vivo detecta aberrações cromossómicas nas mitoses das espermatogónias. O método não diz respeito a outros tipos de células.

Para detectar aberrações cromatídicas em células espermatogónias deve examinar-se a primeira divisão mitótica da célula após a exposição, antes que as eventuais lesões sejam perdidas por via de divisões celulares subsequentes. Para obtenção de informação adicional sobre as células germinais das espermatogónias expostas pode proceder-se à análise dos cromossomas durante a meiose, para detecção de aberrações cromossómicas na diacinese-metafase I, momento em que as células expostas passam à forma de espermatócitos.

O presente ensaio in vivo foi concebido para investigar se os agentes mutagénicos das células somáticas também são activos para as células germinais. Além disso, o ensaio das espermatogónias é relevante para a avaliação dos riscos de mutagenicidade, na medida em que permite a consideração dos elementos do metabolismo in vivo, da farmacocinética e dos processos de reparação do ADN.

Nos testículos estão presentes diversas gerações de espermatogónias, com diferentes graus de sensibilidade ao tratamento químico. Logo, as aberrações detectadas representam uma resposta agregada das várias populações de células espermatogónias expostas, com predominância para as células espermatogónias mais diferenciadas, que são em maior número. Dependendo da sua posição no testículo, diferentes gerações de espermatogónias poderão ou não ser expostas à circulação geral, devido à barreira física e fisiológica constituída pelas células de Sertoli e à barreira sangue-testículo.

Se existirem provas de que nem a substância em estudo nem nenhum dos seus metabolitos reactivos entram em contacto com o tecido objectivo, o presente ensaio não é apropriado.

V., também, a parte B da introdução geral.

1.2 Definições

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

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

Lacuna: lesão acromática de extensão inferior à largura de um cromátídeo e que determine um ligeiro desalinhamento do mesmo.

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

Poliploidia: número de cromossomas múltiplo do número haplóide (n), mas diferente do diplóide (ou seja; $3n$, $4n$, e assim por diante).

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

1.3 Princípio do método de ensaio

Os animais são expostos à substância em estudo através de um modo de exposição apropriado, sendo sacrificados passado o tempo necessário após a exposição. Antes do sacrifício, os animais são tratados com um agente de fixação da metafase (por exemplo: colchicina ou Colcemid(marca registada)). Seguidamente, são feitas preparações de cromossomas a partir das células germinais e, após serem coradas, as células em metafase são analisadas para detecção de aberrações cromossómicas.

1.4 Descrição do método de ensaio

1.4.1 Preparação

1.4.1.1 Selecção das espécies animais

Geralmente, são utilizados ratos ou hamsters chineses machos, embora possam ser utilizados machos de qualquer outra espécie de mamífero apropriada. Devem ser utilizados animais adultos saudáveis jovens das raças de laboratório mais comuns. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder (mais ou menos) 20% do peso médio de cada sexo.

1.4.1.2 Condições de acomodação e alimentação

Devem ser aplicadas as condições gerais referidas na introdução geral, parte B, embora o objectivo para a humidade deva ser de 50%-60%.

1.4.1.3 Preparação dos animais

Os animais machos adultos saudáveis jovens são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. As gaiolas devem ser dispostas de modo que eventuais

efeitos devidos à respectiva colocação sejam minimizados. Os animais são identificados de forma inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias antes de se iniciar o estudo.

1.4.1.4 Preparação das doses

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes de serem administradas aos animais. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2 Condições do ensaio

1.4.2.1 Solvente/veículo

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, não devendo produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente/veículo aquoso.

1.4.2.2 Controlos

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo). Com excepção da exposição à substância em estudo, todos os animais, incluindo os dos grupos de controlo, devem ser manuseados de forma idêntica.

Os controlos positivos devem produzir aberrações estruturais *in vivo* nas células espermatogónias quando administrados aos níveis de exposição a que se espera o surgimento de um aumento detectável em relação à linha de base.

A dose de controlo positiva a administrar deve ser escolhida de modo que os seus efeitos sejam claros mas também que as lâminas codificadas não sejam imediatamente identificadas pela pessoa que procede às leituras. É aceitável que o controlo positivo seja administrado por uma via diferente da substância em estudo e que só seja realizada uma amostra. A possibilidade de utilização de produtos químicos de uma classe relacionada para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam. As substâncias de controlo positivo podem incluir, por exemplo:

(ver quadro no documento original)

Para cada amostragem prevista devem ser incluídos controlos negativos expostos apenas ao solvente ou veículo, que serão sujeitos exactamente ao mesmo procedimento que os grupos expostos, a menos que existam dados históricos de controlo aceitáveis em relação à variabilidade de animal para animal e à frequência da ocorrência de células com aberrações cromossómicas. Além disso, devem ser também preparados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que existam dados de controlo históricos ou publicados que mostrem que o solvente/veículo escolhido não induz qualquer efeito deletério ou mutagénico.

1.5 Procedimento

1.5.1 Número de animais

Cada grupo exposto e de controlo deve incluir pelo menos cinco animais machos analisáveis.

1.5.2 Programação do tratamento

As substâncias de ensaio são preferivelmente administradas numa ou em duas doses (ou seja, numa só exposição ou em duas exposições). As substâncias poderão igualmente ser administradas numa dose dividida, ou seja, duas exposições no mesmo dia, separadas por apenas algumas horas, para facilitar a administração de grandes volumes. Qualquer outro regime de administração terá de ser cientificamente justificado.

No grupo exposto à dose mais elevada serão realizadas duas amostras após a exposição. Uma vez que a cinética celular poderá ser afectada pela substância em estudo, serão colhidas duas

amostras, uma cerca de 24 horas após a exposição e outra cerca de 48 horas após a exposição. Para os restantes animais deve ser colhida uma amostra 1,5 ciclos celulares normais ou 24 horas após a exposição, a não ser nos casos em que se saiba que a utilização de outros tempos de amostragem é mais apropriada para a detecção dos efeitos (ver nota 6).

Para além disso, poderão ser utilizados outros tempos de amostragem. Assim, por exemplo, no caso de produtos químicos que possam induzir lagging cromossómico ou efeitos independentes do factor S, poderá ser necessário fazer a amostragem mais cedo (ver nota 1).

A necessidade ou não de uma repetição da exposição terá de ser avaliada caso a caso. Se o tratamento for repetido, os animais devem ser sacrificados 24 horas (1,5 ciclos celulares) após a última exposição. Quando necessário, poderão ser realizadas amostras adicionais.

Antes do sacrifício, os animais são injectados intraperitonealmente com uma dose apropriada de um agente de fixação da metafase (por exemplo: Colcemid(marca registada) ou colchicina). As amostras serão colhidas a intervalos regulares a partir desse momento. Esse intervalo corresponde a aproximadamente 3-5 horas para os ratos e a 4-5 horas para os hamsters chineses.

1.5.3 Doses

Se for realizado um estudo para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados, esse estudo deve ser executado no mesmo laboratório, utilizando as mesmas espécies, linha celular e regime de exposição a utilizar no estudo principal (ver nota 7). Se existir toxicidade, serão utilizadas três doses diferentes para a primeira amostragem. Essas doses devem abranger uma gama de toxicidade máxima a quase nula. Na segunda amostragem só será necessário avaliar a dose mais elevada. A dose mais elevada é definida como a dose que produz sinais de toxicidade tais que indiquem que a utilização de doses superiores, com o mesmo regime de administração, produzirá mortalidade. As substâncias com actividade biológica específica em doses baixas e não tóxicas (como acontece com as hormonas e agentes mitogénicos) poderão constituir uma excepção aos critérios de fixação da dose, devendo ser avaliadas numa base casuística. A dose mais elevada pode igualmente ser definida como uma dose que produz algumas indicações de toxicidade nas espermatogónias (por exemplo: redução da taxa de mitose das espermatogónias na primeira e segunda metafases meióticas; essa redução não deve ser superior a 50%).

1.5.4 Ensaio limite

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se não for previsível a existência de toxicidade genética com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, poderá não ser considerado necessário um estudo completo com utilização de três doses diferentes. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios limite.

1.5.5 Administração das doses

A substância em estudo é geralmente administrada por sonda esofágica, utilizando um tubo estomacal ou cânula de intubação apropriada, ou por injeção intraperitoneal. Poderão ser aceites, mediante justificação, outras vias de administração. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez por sonda esofágica ou por injeção depende também do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes mais elevados deve ser justificada. Com excepção das substâncias que causem irritação ou que sejam corrosivas, cujos efeitos serão normalmente agravados em concentrações mais altas, a variabilidade do volume de ensaio deve ser minimizada através do ajustamento das concentrações, por forma a garantir um volume constante para todas as doses a administrar.

1.5.6 Preparação dos cromossomas

Imediatamente após o sacrifício devem ser preparadas suspensões celulares de um ou de ambos os testículos, que serão seguidamente expostas a uma solução hipotónica e fixadas. As células são depois esfregadas em lâminas e coradas.

1.5.7 Análise

Devem ser analisadas pelo menos 100 células em metafase avançada de cada animal (ou seja, um mínimo de 500 metafases por grupo). Este número poderá ser menor quando se verificarem taxas elevadas de aberrações. Todas as lâminas, incluindo as dos controlos positivos e negativos, devem ser independentemente codificadas antes da análise microscópica. Uma vez que os procedimentos de preparação das lâminas dão frequentemente lugar à ruptura de uma certa proporção das células em metafase, com perda de cromossomas, as células contabilizadas devem conter um número de centrómeros igual a $2n$ (mais ou menos) 2.

2 Dados

2.1 Tratamento dos resultados

Os dados respeitantes a cada animal devem ser apresentados num quadro. A unidade experimental é o animal. Para cada animal devem ser verificados o número de células com aberrações cromossómicas e o número de aberrações cromossómicas por célula. Os diferentes tipos de aberração cromossómica estrutural devem ser enumerados com os respectivos números e frequências para os grupos expostos à substância em estudo e de controlo. A ocorrência de lacunas é registada em separado e incluída no relatório, mas não é geralmente contabilizada para o cálculo da frequência total das aberrações.

Se para além das mitoses também se observarem meioses, a relação entre o número de mitoses e de metafases I ou II das espermatogónias deve ser determinada num total de 100 células em divisão por animal, para medição da citotoxicidade em todos os animais expostos à substância em estudo e do controlo negativo, de forma a poder estabelecer se existem efeitos citotóxicos. Se só se observarem mitoses, o índice mitótico deve ser calculado utilizando pelo menos 1000 células de cada animal.

2.2 Avaliação e interpretação dos resultados

Há diversos critérios para determinar um resultado positivo, como por exemplo um aumento do número de células com aberrações cromossómicas relacionado com a dose ou um claro aumento do número de células com aberrações num determinado grupo e numa determinada amostragem. Deve ser tomada em consideração, antes de mais, a importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios poderão ser utilizados métodos estatísticos (ver nota 8), embora a significância estatística não deva ser o único elemento para a determinação de uma resposta positiva. Os resultados ambíguos devem ser esclarecidos através de estudos adicionais, de preferência com modificação das condições experimentais.

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios acima indicados no presente ensaio é considerada não mutagénica.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos, independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio in vitro para aberrações cromossómicas em espermatogónias indica que a substância em estudo induz aberrações cromossómicas estruturais nas células germinais das espécies testadas. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz aberrações cromossómicas estruturais nas células germinais das espécies testadas.

Deve ser discutida a probabilidade de a substância em estudo ou os seus metabolitos alcançarem o sistema circulatório geral ou especificamente o tecido objectivo.

3 Apresentação de relatórios

Relatório de ensaio

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

- justificação para a escolha do veículo;
- solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/veículo, se conhecida.

Animais de ensaio:

- espécie/linha celular utilizada;
- número e idade dos animais;
- origem, condições de acomodação, alimentação, etc.;
- peso de cada animal no início do ensaio, incluindo a gama de pesos, a respectiva média e o desvio padrão para cada grupo.

Condições de ensaio:

- resultados do estudo para definição da gama de doses, quando tenha sido realizado;
- justificação para a selecção das doses;
- justificação da via de administração escolhida;
- preparação da substância em estudo;
- modo de administração da substância em estudo;
- justificação do momento do sacrifício;
- conversão da concentração da substância em estudo (ppm) na alimentação/abeberação para a dose real (mg/kg peso corporal/dia), quando aplicável;
- qualidade dos alimentos e da água;
- descrição pormenorizada dos calendários de tratamento e amostragem;
- métodos de medição da toxicidade;
- substância utilizada para fixar a metafase, respectiva concentração e duração da exposição;
- métodos de preparação das lâminas;
- critérios de contabilização das aberrações,
- número de células analisadas por animal;
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo.

Resultados:

- sinais de toxicidade;
- índice mitótico;
- proporção de células espermatogónias em mitose em relação às células em metafase I ou II;
- tipo e número de aberrações, discriminados para cada animal;
- número total de aberrações por grupo;
- número de células aberrantes por grupo;
- relação dose-resposta, quando seja possível determinar;
- análise estatística, quando tenha sido realizada;
- dados relativos ao controlo negativo realizado em paralelo com o ensaio;
- dados históricos sobre o controlo negativo, com os respectivos gama, valor médio e desvio padrão;
- dados relativos ao controlo positivo realizado em paralelo com o ensaio;
- alterações da ploidia, quando observadas.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4 Bibliografia

(nota 1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in Genetic Toxicology of Environmental

Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B., and Magnusson, J. (eds.), Liss, New York. pp. 477-484.

(nota 2) Adler, I. D. (1984), Cytogenic tests in Mammals, in *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(nota 3) Evans, E. P., Breckon, G., and Ford, C. E. (1964), An Air-drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, pp. 289-294.

(nota 4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G., and Henderson L. (1990), In Vivo Cytogenetic Assays, in D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(nota 5) Yamamoto, K., and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res.*, 52, pp. 207-209.

(nota 6) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T., and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, *Mutation Res.*, 312, pp. 313-318.

(nota 7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J., and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.

(nota 8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G., and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays, in D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

ANEXO X

B.39 Ensaio in vivo da síntese não programada (UDS) de ADN em células do fígado de mamíferos

1 Método

O presente método é idêntico ao método OCDE TB 486 - Ensaio in vivo da síntese não programada (UDS) de ADN em células do fígado de mamíferos (1997).

1.1 Introdução

O objectivo do ensaio in vivo da síntese não programada (UDS) de ADN em células do fígado de mamíferos é identificar as substâncias que induzem a reparação do ADN nas células do fígado de animais expostos à substância em estudo (ver nota 1) (ver nota 2) (ver nota 3) (ver nota 4).

O presente ensaio in vivo apresenta um método para investigação dos efeitos dos produtos químicos genotóxicos sobre o fígado. O valor limite medido é indicativo dos danos e da subsequente reparação do ADN em células do fígado. O fígado é geralmente o local principal de metabolização dos compostos absorvidos, pelo que é particularmente apropriado para avaliar os danos do ADN in vivo.

Se existirem provas de que nem a substância em estudo nem nenhum dos seus metabolitos reactivos entram em contacto com o tecido objectivo, o presente ensaio não é apropriado.

O ponto final da síntese não programada (UDS) de ADN é medido através da determinação da incorporação de nucleótidos marcados por células que não se encontram numa fase de síntese programada de ADN (fase S). A técnica mais utilizada é a determinação da incorporação de timidina marcada com trítio ((elevado a 3)H-TdR) por auto-radiografia. Nos

ensaios UDS in vivo são geralmente utilizados fígados de rato. Podem também ser utilizados outros tecidos, mas não é esse o objectivo do presente método.

A detecção de uma resposta UDS depende do número de bases do ADN excizadas e substituídas no local danificado. Por conseguinte, o ensaio UDS é particularmente válido para a detecção de «reparação de cadeias longas» (20-30 bases) induzida pela substância. A «reparação de cadeias curtas» (1-3 bases) é, pelo contrário, detectada com uma sensibilidade muito mais baixa. Além disso, podem existir eventos mutagénicos decorrentes da não reparação, reparação incorrecta ou de problemas de replicação das lesões do ADN. A extensão da resposta UDS não dá qualquer indicação em relação à fidelidade do processo de reparação. Além disso, é possível que um agente mutagénico reaja com o ADN, mas que os danos do ADN não sejam posteriormente reparados através de um processo de reparação da excisão. A ausência de informação específica sobre a actividade mutagénica do ensaio UDS é compensada pela potencial sensibilidade do seu ponto final, uma vez que é medido na totalidade do genoma.

V. também a parte B da introdução geral.

1.2 Definições

Células em reparação: apresentam uma granulação nuclear líquida (NNG) superior a um valor predeterminado, a justificar pelo laboratório que conduz o ensaio.

Granulação nuclear líquida (NNG): medida quantitativa da actividade celular UDS em ensaios auto-radiográficos UDS, calculada pela subtracção do número médio de grânulos citoplásmicos em sectores citoplásmicos equivalentes ao núcleo (CG), ao número de grânulos nucleares (NG): $NNG = NG - CG$. As contagens NNG são calculadas para cada célula e são depois ponderadas para as células de uma cultura, em culturas paralelas, etc.

Síntese não programada (UDS) de ADN: síntese de reparação do ADN após excisão e remoção de uma sequência de ADN que contém uma região danificada por indução de substâncias químicas ou de agentes físicos.

1.3 Princípio do método de ensaio

O ensaio UDS in vivo em células do fígado de mamíferos indica a ocorrência de uma síntese de reparação do ADN após excisão e remoção de uma sequência de ADN que continha uma região danificada por indução de substâncias químicas ou de agentes físicos. O ensaio baseia-se geralmente na incorporação de (elevado a 3)H-TdR no ADN de células do fígado com uma baixa proporção de células na fase S do ciclo celular. A incorporação de (elevado a 3)H-TdR é geralmente determinada por auto-radiografia, uma vez que esta técnica não é tão sensível à interferência das células em fase S como, por exemplo, a contagem de cintilação em meio líquido.

1.4 Descrição do método

1.4.1 Preparação

1.4.1.1 Selecção das espécies animais

Geralmente são utilizados ratos, embora possa ser utilizada qualquer outra espécie de mamífero apropriada. Devem ser utilizados animais adultos saudáveis jovens das raças de laboratório mais comuns. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder (mais ou menos) 20% do peso médio de cada sexo.

1.4.1.2 Condições de acomodação e alimentação

Devem ser aplicadas as condições gerais referidas na introdução geral, parte B, embora o objectivo para a humidade deva ser de 50%-60%.

1.4.1.3 Preparação dos animais

Os animais adultos saudáveis jovens são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. As gaiolas devem ser dispostas de modo que eventuais efeitos devidos à respectiva colocação sejam minimizados. Os animais são identificados de forma

inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias antes de se iniciar o estudo.

1.4.1.4 Preparação das doses

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes de serem administradas aos animais. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2 Condições do ensaio

1.4.2.1 Solvente/veículo

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, não devendo produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente/veículo aquoso.

1.4.2.2 Controlos

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo). Com excepção da exposição à substância em estudo, todos os animais, incluindo os dos grupos de controlo, devem ser manuseados de forma idêntica.

Os controlos positivos devem ser substâncias comprovadamente causadoras de UDS quando administradas aos níveis de exposição a que se espera o surgimento de um aumento detectável em relação à linha de base. Os controlos positivos que exijam activação metabólica devem ser utilizados em doses que desencadeiem uma resposta moderada (ver nota 4). A dose de controlo positiva a administrar deve ser escolhida de modo que os seus efeitos sejam claros, mas também que as lâminas codificadas não sejam imediatamente identificadas pela pessoa que procede às leituras. As substâncias de controlo positivo podem incluir, por exemplo:

(ver quadro no documento original)

Podem ser utilizadas outras substâncias de controlo positivo apropriadas. O controlo positivo pode ser administrado por uma via diferente da substância em estudo.

1.5 Procedimento

1.5.1 Número e sexo de animais

Deve ser utilizado um número de animais suficiente para que a variação biológica natural seja tomada em consideração nos resultados do ensaio, com pelo menos três animais analisáveis por grupo. Se já existir uma base de dados históricos significativa, os grupos de controlo positivo e negativo poderão conter apenas um ou dois animais.

Se no momento do estudo existirem dados disponíveis de estudos com as mesmas espécies e com utilização da mesma via de administração que demonstrem que não há qualquer diferença substancial de toxicidade entre os sexos, será suficiente testar um único sexo, de preferência o sexo masculino. Nos casos em que a exposição humana aos produtos químicos possa ser específica a cada sexo, como acontece com alguns produtos farmacêuticos, o ensaio deve ser executado com animais do sexo em causa.

1.5.2 Programação do tratamento

As substâncias de ensaio são preferivelmente administradas numa única exposição.

1.5.3 Doses

Normalmente, são utilizadas pelo menos duas doses diferentes. A dose mais elevada é definida como a dose que produz sinais de toxicidade tais que indiquem que a utilização de doses superiores, com o mesmo regime de administração, produzirá mortalidade. Em termos gerais, a dose inferior deve ser de 25%-50% da dose mais elevada.

As substâncias com actividade biológica específica em doses baixas e não tóxicas (como acontece com as hormonas e agentes mitogénicos) poderão constituir uma excepção aos critérios de fixação da dose, devendo ser avaliadas caso a caso. Se for realizado um estudo para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados, esse estudo deve ser executado no mesmo laboratório, utilizando as mesmas espécies, linha celular, sexo e regime de exposição a utilizar no estudo principal.

A dose mais elevada pode igualmente ser definida como uma dose que produz algumas indicações de toxicidade no fígado (por exemplo, núcleos picnóticos).

1.5.4 Ensaio limite

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se não for previsível a existência de toxicidade genética com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, poderá não ser considerado necessário um estudo completo. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios limite.

1.5.5 Administração das doses

A substância em estudo é geralmente administrada por sonda esofágica, utilizando um tubo estomacal ou cânula de intubação apropriada. Poderão ser aceites, mediante justificação, outras vias de administração, mas a via intraperitoneal não é recomendada, uma vez que poderá expor o fígado à substância em estudo directamente, e não através do sistema circulatório. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez por sonda esofágica ou por injeção depende também do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes mais elevados deve ser justificada. Com excepção das substâncias que causem irritação ou que sejam corrosivas, cujos efeitos serão normalmente agravados em concentrações mais altas, a variabilidade do volume de ensaio deve ser minimizada através do ajustamento das concentrações, por forma a garantir um volume constante para todas as doses a administrar.

1.5.6 Preparação das células de fígado

As células do fígado são normalmente preparadas a partir dos animais expostos à substância em estudo 12-16 horas após a administração da substância em estudo. Geralmente será necessário realizar uma primeira amostra (normalmente 2-4 horas após a exposição), que só não terá de ser utilizada quando haja uma resposta positiva clara às 12-16 horas. Contudo, podem ser utilizados outros tempos de amostragem, desde que sejam justificados com base em dados toxicocinéticos.

As culturas celulares de curta duração do fígado de mamíferos são geralmente preparadas irrigando o fígado in situ com collagenase e deixando que algumas células livres separadas do fígado há pouco tempo se fixem a uma superfície apropriada. As células do fígado de animais do controlo negativo devem ter uma viabilidade de pelo menos 50% (ver nota 5).

1.5.7 Determinação da UDS

As células de fígado de mamífero isoladas há pouco tempo são geralmente incubadas num meio que contém (elevado a 3)H-TdR durante um período adequado, por exemplo 3-8 horas. No final do período de incubação, as células são lavadas para remover o meio residual e depois incubadas num meio com excesso de timidina não rotulada, para diminuir a radioactividade não incorporada («lavagem a frio»). As células são então enxaguadas, fixadas e secas. Para os tempos de incubação mais prolongados, pode não ser necessária a lavagem a frio. As lâminas são mergulhadas na emulsão auto-radiográfica, expostas na obscuridade (ou seja, refrigeradas durante 7-14 dias), reveladas e coradas, após o que se procede à contagem dos grânulos de prata expostos. Devem ser preparadas duas ou três lâminas de cada animal.

1.5.8 Análise

As preparações devem conter um número suficiente de células com morfologia normal para permitir uma avaliação significativa da UDS. As preparações são examinadas microscopicamente para sinais de citotoxicidade evidente (por exemplo, picnose e níveis diminuídos de radiação proveniente da timina rotulada).

As lâminas devem ser codificadas antes da contagem dos grânulos. Normalmente são contadas 100 células de cada animal, de pelo menos duas lâminas; se forem contadas menos de 100 células/animal, deve ser fornecida uma justificação. As contagens dos grânulos dos núcleos em fase S não são tomadas em consideração, mas a proporção de células em fase S pode ser registada.

O grau de incorporação da (elevado a 3)H-TdR nos núcleos e citoplasma das células morfológicamente normais, evidenciado pelo depósito de grânulos de prata, deve ser determinado por métodos apropriados.

As contagens de grânulos são determinadas nos núcleos (grânulos nucleares, NG) e em sectores do citoplasma equivalentes ao núcleo (grânulos citoplásmicos, CG). As contagens de CG são feitas no sector do citoplasma mais rotulado ou fazendo a média de dois ou três locais com grânulos citoplásmicos escolhidos aleatoriamente junto à região do núcleo. Outros métodos de contagem (por exemplo, contagem de células inteiras) podem ser utilizados, se se justificarem (ver nota 6).

2 Dados

2.1 Tratamento dos resultados

Devem ser apresentados dados relativos a cada lâmina e a cada animal. Para além disso, todos os dados devem ser apresentados sob a forma de um quadro. As contagens de granulação nuclear líquida (NNG) devem ser calculadas para cada célula, para cada animal, para cada dose e para cada tempo de colheita, subtraindo as contagens CG das contagens NG. Se forem contadas as «células em reparação», os critérios para definir essas células devem ser justificados e baseados em dados históricos ou dos controlos negativos realizados em paralelo com o ensaio. Os resultados numéricos podem ser avaliados através de métodos estatísticos. Os métodos estatísticos a utilizar eventualmente devem ser escolhidos e justificados antes da realização do estudo.

2.2 Avaliação e interpretação dos resultados

Os exemplos de critérios para a definição de uma resposta como positiva/negativa incluem: positiva i) Valores de NNG positivos, acima de um limiar predefinido, justificado com base nos dados históricos do laboratório; ou ii) Valores de NNG significativamente superiores aos do controlo em paralelo; negativa i) Valores de NNG iguais/inferiores ao limiar de controlo histórico; ou ii) Valores de NNG não significativamente superiores aos do controlo em paralelo.

A importância biológica dos dados deve ser considerada, ou seja, devem ser tomados em consideração parâmetros como a variação de animal para animal, a relação dose/resposta e a citotoxicidade. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos, embora a significância estatística não deva ser o único elemento para a determinação de uma resposta positiva.

Embora a maioria das experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio UDS em células do fígado de mamíferos in vivo indica que a substância em estudo induz danos no ADN das células do fígado de mamíferos in vivo que podem ser reparados por síntese não programada de ADN in vitro. Um resultado negativo

indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz danos no ADN que sejam detectáveis pelo presente ensaio.

Deve ser discutida a probabilidade de a substância em estudo ou os seus metabolitos alcançarem o sistema circulatório geral ou especificamente o tecido objectivo (ou seja, a toxicidade sistémica).

3 Apresentação de relatórios

Relatório de ensaio

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

- justificação para a escolha do veículo;
- solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/veículo, se conhecida.

Animais de ensaio:

- espécie/linha celular utilizada;
- número, idade e sexo dos animais;
- origem, condições de acomodação, alimentação, etc.;
- peso de cada animal no início do ensaio, incluindo a gama de pesos, a respectiva média e o desvio padrão para cada grupo.

Condições de ensaio:

- controlos positivos e negativos veículo/solvente;
- resultados do estudo para definição da gama de doses, quando tenha sido realizado;
- justificação para a selecção das doses;
- preparação da substância em estudo;
- modo de administração da substância em estudo;
- justificação da via de administração escolhida;
- métodos usados para verificar se o agente em estudo atingiu o sistema circulatório geral, caso tenham sido utilizados;
- conversão da concentração da substância em estudo na alimentação/abebeção (ppm) para a dose real (mg/kg peso corporal/dia), quando aplicável;
- qualidade dos alimentos e da água;
- descrição pormenorizada dos calendários de tratamento e amostragem;
- métodos de medição da toxicidade;
- método de preparação e cultura das células do fígado;
- técnica de auto-radiografia utilizada;
- número de lâminas preparadas e número de células contabilizadas;
- critérios de avaliação;
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo.

Resultados:

- valores médios das contagens de grânulos nucleares, grânulos citoplásmicos e da granulação nuclear líquida para cada lâmina, animal e grupo;
- relação dose-resposta, quando seja possível determinar;
- análise estatística, quando tenha sido realizada;
- sinais de toxicidade;
- dados relativos aos controlos positivos e negativos (solvente/veículo) realizados em paralelo com o ensaio;
- dados históricos relativos aos controlos positivos e negativos (solvente/veículo) realizados em paralelo com o ensaio, com os respectivos gama, valor médio e desvio padrão;
- número de células «em reparação», caso tenham sido contabilizadas;
- número de células em fase S, caso tenham sido contadas;
- viabilidade das células.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4 Bibliografia

(nota 1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 156, pp. 1-18.

(nota 2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G., and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 123-133.

(nota 3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., Benford, D. J., Dean, S. W., and Mitchell, I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in Kirkland, D. J., and Fox M. (eds.), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures, UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part II revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

(nota 4) Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A., and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo, *Mutations Res.*, 312, pp. 263-285.

(nota 5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E., and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the In Vivo/In Vitro DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.*, 291, pp. 21-27.

(nota 6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K., Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the In Vivo/In Vitro Hepatocyte DNA Repair Assay, *Environ Mutagen*, 4, pp. 553-562.

ANEXO XI

B.40 Corrosividade cutânea

1 Método

1.1 Introdução

O Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM, Centro Comum de Investigação, Comissão Europeia) reconheceu a validade científica de dois ensaios in vitro para a corrosividade cutânea, o ensaio de resistência eléctrica transcutânea (transcutaneous electrical resistance - TER) em pele de rato e um ensaio com um modelo de pele humana (ECVAM, Centro Comum de Investigação, Comissão Europeia) (ver nota 1) (ver nota 2) (ver nota 3). Os estudos de validação levados a cabo pelo ECVAM demonstraram que ambos os ensaios permitem distinguir de forma fiável as substâncias corrosivas das não corrosivas para a pele. Para além disso, o protocolo do ensaio baseado no modelo de pele humana permitiu distinguir correctamente entre os diferentes graus de efeito corrosivo (R35 - altamente corrosivo e R34 - corrosivo) (ver nota 2). Apresentam-se a seguir a descrição e os procedimentos de ambos os ensaios; a escolha do ensaio depende das exigências específicas e das preferências do utilizador.

V. também a introdução geral, parte B.

1.2 Definições

Corrosividade cutânea: produção de danos irreversíveis dos tecidos cutâneos no seguimento da aplicação de material de ensaio.

1.3 Substâncias de referência

Nenhuma especificada, mas v. pontos 1.5.3.4 e 1.7.2.3.

1.4 Princípio do método de ensaio - Ensaio TER em pele de rato

O material a testar é aplicado durante um período de até 24 horas sobre a superfície da epiderme de discos de pele de ratos jovens sacrificados sem crueldade. Os materiais corrosivos são identificados pela sua capacidade de causarem uma perda da integridade

normal do stratum corneum e da função de barreira, perda essa que é medida pela redução do TER intrínseco abaixo de um determinado limiar (5 k(Ω)) (ver nota 4) (ver nota 5). Os materiais simplesmente irritantes e os materiais não irritantes não reduzem o TER abaixo desse limiar. Para as substâncias tensoactivas e para os compostos orgânicos neutros, pode ainda ser incorporado no ensaio um passo de ligação a um corante [para as definições neste contexto, v. a referência (ver nota 6)], a fim de reduzir o número de falsos positivos característico dos ensaios deste tipo de substâncias químicas (ver nota 2) (ver nota 7).

1.5 Descrição do método de ensaio - Ensaio TER em pele de rato

1.5.1 Animais

Para a preparação dos discos de pele são utilizados ratos jovens (20-23 dias) (Wistar ou estirpe comparável). Os pelos dorsais e dos flancos são removidos cuidadosamente, com a ajuda de pequenas tesouras. Os animais são depois cuidadosamente lavados e esfregados, devendo a zona da pele que irá ser utilizada ser mergulhada numa solução antibiótica (contendo, por exemplo, estreptomicina, penicilina, cloranfenicol e anfoteriicina a concentrações suficientes para inibir o crescimento bacteriano). Os animais são novamente lavados com uma solução antibiótica no terceiro ou no quarto dia após a primeira lavagem, devendo depois ser utilizados num prazo de três dias (para a preparação das peles não deverão ser utilizados animais com uma idade superior a 31 dias).

1.5.2 Preparação dos discos de pele

Os animais são sacrificados sem crueldade. A pele dorsal dos animais é depois retirada e a gordura em excesso é removida através de raspagem cuidadosa. A pele é colocada sobre a extremidade de um tubo de politetrafluoroetileno/(PTFE), com o cuidado de garantir que a superfície epidérmica esteja em contacto com o tubo. A pele é fixa na extremidade do tubo com uma junta tónica em borracha e elimina-se o tecido em excesso. As dimensões do tubo e da junta tónica são as apresentadas na figura 1. A junta tónica deve ser envolvida em vaselina, de forma a garantir a estanqueidade da sua união com o tubo de PTFE. O tubo é depois suspenso por uma mola dentro de uma câmara com uma solução de sulfato de magnésio (154 mM) (figura 2).

1.5.3 Procedimento de ensaio

1.5.3.1 Aplicação do material de ensaio

As substâncias de ensaio líquidas (150 (mi)l) são aplicadas na superfície epidérmica no interior do tubo (figura 2). Quando a substância de ensaio for sólida, deverá ser aplicada uma quantidade suficiente para garantir a cobertura de toda a superfície epidérmica. Por cima dessa substância é depois acrescentada água desionizada (150 (mi)l) e os tubos são ligeiramente agitados. As substâncias de ensaio deverão estar em contacto com toda a superfície da pele. No caso de algumas substâncias sólidas, poderá ser necessário aquecer a mistura a 30°C para fluidificar a substância ou ainda proceder a uma moagem para obtenção de um material granular ou pulverulento.

Para cada substância de ensaio serão utilizados três discos de pele. As substâncias de ensaio são aplicadas durante um período de 24 horas (v. também o ponto 1.5.3.4). A substância de ensaio deverá depois ser removida por lavagem em água corrente a uma temperatura máxima de 30°C até à remoção completa de todo o material. A remoção das substâncias de ensaio que tenham eventualmente solidificado poderá ser facilitada utilizando um jacto de água a uma temperatura de cerca de 30°C.

1.5.3.2 Medições TER

A TER é medida utilizando um databridge de corrente alterna de baixa voltagem (por exemplo: AIM 401 ou 6401, ou outro modelo equivalente). Antes da medição da resistência eléctrica, a tensão superficial da pele é reduzida através da adição de um volume suficiente de etanol a 70% para cobrir toda a epiderme. Após alguns segundos, o etanol deverá ser removido invertendo o tubo e o tecido é depois hidratado através da adição de 3 ml de solução

de sulfato de magnésio (154 mM). Os eléctrodos do databridge são colocados em duas extremidades do disco de pele de forma a medir a resistência em $k(\Omega)/\text{disco}$ (figura 2). As dimensões dos eléctrodos e o comprimento de eléctrodo que deverá ficar livre por baixo da mola são indicados na figura 1. A parte interior (mais grossa) do eléctrodo deverá estar apoiada à borda do tubo de PTFE durante a medição da resistência, de forma a garantir que o comprimento de eléctrodo mergulhado na solução de sulfato de magnésio seja constante. O eléctrodo exterior (mais fino) deverá ser colocado dentro da câmara receptora de forma a tocar o fundo da mesma. A distância entre a parte inferior da mola e o fundo do tubo de PTFE deverá ser mantida constante (figura 1), visto que afecta o valor de resistência medido.

De notar que nos casos em que seja medida uma resistência superior a 20 $k(\Omega)$, isso se poderá dever ao facto de a substância de ensaio estar a impedir o acesso da solução ao disco de epiderme. Para resolver esse problema, uma das possibilidades será tapar o tubo de PTFE com o dedo, usando luvas de borracha, e agitar durante cerca de 10 segundos. A solução de sulfato de magnésio deverá então ser deitada fora e substituída por solução fresca para a realização da medição.

A média dos valores de TER medidos poderá ser aceite, desde que os valores medidos em amostras de controlo positivo e negativo simultâneas com o ensaio se encontrem dentro dos valores normais para o método. As substâncias de controlo que poderão ser utilizadas e os respectivos valores aceitáveis para a metodologia e instrumentos aqui descritos são:

(ver quadro no documento original)

1.5.3.3 Procedimento alterado para as substâncias tensoactivas e para as substâncias orgânicas neutras

Se os valores de TER das substâncias de ensaio que sejam tensoactivas ou que sejam substâncias orgânicas neutras forem inferiores ou iguais a 5 $k(\Omega)$, poderá proceder-se a uma avaliação da penetração de corantes nos tecidos. Esse procedimento permitirá determinar se os resultados são ou não falsos positivos (ver nota 2).

1.5.3.3.1 Aplicação e eliminação do corante sulforhodamina B

Após o tratamento inicial com a substância de ensaio, aplicam-se à superfície epidérmica de cada disco de pele 150 (μ l) de uma solução a 10% (p/v) do corante sulforhodamina B em água destilada, durante 2 horas. Os discos são depois lavados em água corrente à temperatura ambiente durante cerca de 10 segundos, a fim de remover o corante em excesso/não fixado. Os discos de pele deverão então ser cuidadosamente retirados do tubo de PTFE e colocados num recipiente (por exemplo: um frasco de 20 ml) com água desmineralizada (8 ml). Os frascos são cuidadosamente agitados durante 5 minutos, para remover o corante que eventualmente ainda exista em excesso/não fixado. Esse procedimento de lavagem deverá depois ser repetido, após o que os discos de pele deverão ser transferidos para frascos com 5 ml de uma solução a 30% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) em água destilada e incubados a 60°C de um dia para o outro. Após a incubação, os discos de pele são retirados e deitados fora, e a solução centrifugada durante 8 minutos a 21°C (força relativa de centrifugação: ~ 175). Uma amostra de 1 ml do sobrenadante será então diluída num factor de 1:5 (v/v) [ou seja, 1 ml + 4 ml] numa solução a 30% (p/v) de SDS em água destilada. A densidade óptica (DO) da solução deverá então ser medida a cerca de 565 nm.

1.5.3.3.2 Cálculo do teor em corante

O teor do corante sulforhodamina B por disco é calculado a partir dos valores de DO (coeficiente de extinção molar do corante sulforhodamina B a 565 nm = $8,7 \times 10^4$ (elevado a 4); peso molecular = 580). O teor deverá ser determinado para cada disco de pele e também em termos de valor médio dos replicados. Poderão ser aceitáveis valores médios para a ligação do corante, desde que os valores medidos nos controlos se encontrem dentro das gamas normais para o método. As gamas de concentração do corante que poderão ser utilizadas nas substâncias de controlo para a metodologia e instrumentos aqui descritos são:

(ver quadro no documento original)

1.5.3.4 Informação adicional

As substâncias de ensaio também poderão ser aplicadas por períodos de tempo menores (por exemplo, 2 horas), para identificação dos materiais mais severamente corrosivos. Contudo, no estudo de validação, verificou-se que o ensaio TER resulta na sobrestimação do potencial corrosivo de diversos materiais de ensaio quando se utiliza uma aplicação de apenas 2 horas (ver nota 2), embora permita uma identificação correcta das substâncias corrosivas e não corrosivas após uma aplicação ao longo de 24 horas.

As propriedades e dimensões do aparelho a utilizar nos ensaios e o procedimento experimental aplicado podem influenciar os valores de TER obtidos. O limiar de corrosão de 5 k(Ómega) foi desenvolvido a partir dos dados obtidos com o aparelho e com os procedimentos descritos no presente método. Poderão ser aplicáveis outros limiares e valores de controlo se as condições do ensaio forem significativamente diferentes. Logo, recomenda-se que a metodologia e os valores para o limiar de resistência sejam calibrados através do ensaio de uma série de materiais de referência a seleccionar de entre os materiais utilizados no estudo de validação (ver nota 3).

1.6 Princípio do método de ensaio - Ensaio em modelo de pele humana

O material de ensaio é aplicado localmente por um período que poderá ir até 4 horas num modelo tridimensional de pele humana, que inclui uma epiderme reconstruída com um stratum corneum funcional. Os materiais corrosivos são identificados pela sua capacidade de diminuição da viabilidade celular (que poderá ser determinada, por exemplo, utilizando o ensaio de redução MTT) abaixo de determinados limiares em função dos períodos de exposição utilizados. O princípio do ensaio baseia-se na hipótese de que as substâncias químicas corrosivas são as que conseguem penetrar o stratum corneum (por difusão ou por erosão) e que são suficientemente citotóxicas para causar morte celular nas camadas celulares subjacentes.

1.7 Descrição do método de ensaio - Ensaio em modelo de pele humana

1.7.1 Modelo de pele humana

Os modelos de pele humana podem ter diversas origens, mas devem sempre cumprir determinados critérios. Assim, o modelo deverá ter um stratum corneum funcional e uma camada subjacente de células vivas. O stratum corneum deverá ter uma função de barreira adequada. Essa característica poderá ser comprovada através da demonstração da resistência do modelo à citotoxicidade após aplicação de substâncias comprovadamente citotóxicas mas que normalmente não conseguem atravessar o stratum corneum. Para além disso, deverá demonstrar-se que o modelo permite obter resultados reprodutíveis em determinadas condições experimentais.

A viabilidade celular das células vivas do modelo deverá ser suficiente para permitir distinguir bem os resultados das substâncias de controlo positivo e negativo. A viabilidade celular (medida, por exemplo, pela redução do MTT, ou seja, por um valor de DO) após a exposição à substância de controlo negativo deverá manter-se em níveis aceitáveis para o modelo de pele específico que esteja a ser utilizado. Da mesma forma, os valores da viabilidade celular após exposição à substância de controlo positivo (por comparação com a viabilidade do controlo negativo) deverá também situar-se dentro de determinados limites. Mais importante ainda, o modelo preditivo utilizado deverá ter sido certificado de acordo com normas de validação internacionais (ver nota 2).

1.7.2 Procedimento de ensaio

1.7.2.1 Aplicação do material de ensaio

Para os materiais líquidos deverá ser aplicada uma quantidade suficiente para cobrir toda a superfície de pele (no mínimo 25 (mi)l/cm²). Para os materiais sólidos deverá ser também aplicada uma quantidade suficiente para cobrir toda a pele e humidificada por forma a garantir

um bom contacto com a pele: quando necessário, os sólidos poderão ser moídos antes da aplicação. Deverá ser demonstrado que o método de aplicação utilizado é adequado para diversos tipos químicos (ver nota 2). Após o período de exposição, o material de ensaio deverá ser cuidadosamente lavado da superfície da pele com uma solução salina.

1.7.2.2 Medição da viabilidade celular

A viabilidade celular poderá ser medida através de qualquer método quantitativo devidamente validado. O ensaio utilizado mais frequentemente é a redução do MTT, que permite comprovadamente obter resultados fiáveis e reprodutíveis entre laboratórios (ver nota 2). O disco de pele é colocado numa solução MTT a 0,3 mg/ml, a 20°C-28°C durante 3 horas. O precipitado azul de formazan é depois extraído (extracção com solvente) e a sua concentração é medida através da determinação da DO a um comprimento de onda entre 545 nm e 595 nm.

1.7.2.3 Outras informações

O modelo de pele utilizado, tal como o protocolo exacto para o tempo de exposição, os procedimentos de lavagem, etc., terão um impacte significativo sobre os resultados em termos de viabilidade celular. Recomenda-se que a metodologia e o modelo preditivo sejam calibrados através do ensaio de uma série de padrões a escolher de entre os produtos químicos utilizados no estudo de validação do ECVAM (ver nota 3). Um dos factores críticos será a demonstração da reprodutibilidade do método utilizado infra e interlaboratórios para diversos produtos químicos, de acordo com as normas internacionais. O método deverá cumprir, no mínimo, os critérios de validade científica já definidos (ver nota 2) e os resultados dos estudos de validação devem ser publicados em revista científica dedicada a estudos comparativos.

2 Dados

2.1 Tratamento dos resultados

2.1.1 Ensaio TER em pele de rato

Os valores de resistência ($k(\Omega)$) do material de ensaio, dos controlos positivo e negativo e de qualquer produto químico padrão utilizado deverão ser apresentados sob a forma de uma tabela, incluindo todos os dados relativos aos replicados/repetição de experiências, os valores médios e as classificações daí deduzidas em termos de corrosividade.

2.1.2 Ensaio em modelo de pele humana

Os valores da DO e os dados relativos aos cálculos da percentagem de viabilidade celular do material de ensaio, dos controlos positivo e negativo e de qualquer produto químico padrão utilizado deverão ser apresentados sob a forma de uma tabela, incluindo todos os dados relativos aos replicados/repetição de experiências, os valores médios e as classificações daí deduzidas em termos de corrosividade.

2.2 Avaliação e interpretação dos resultados

2.2.1 Ensaio TER em pele de rato

Caso o valor médio de TER obtido para a substância de ensaio seja superior a 5 $k(\Omega)$, a substância é considerada não corrosiva. Se o valor do TER for inferior a ou igual a 5 $k(\Omega)$ e se a substância em causa não for tensoactiva nem um composto orgânico neutro, será considerada corrosiva.

Se a substância for tensoactiva ou um composto orgânico neutro e se o valor de TER for inferior ou igual a 5 $k(\Omega)$, poderá proceder-se a um tratamento com corante. Se o teor médio de corante dos discos for superior ou igual ao teor médio de corante dos discos de controlo positivo com HCl a 36% testados em simultâneo, o resultado da substância de ensaio é um positivo verdadeiro e portanto a substância deve ser considerada corrosiva. Se o teor médio de corante dos discos for inferior ao teor médio de corante dos discos de controlo positivo com HCl a 36% testados em simultâneo, o resultado da substância de ensaio é um falso positivo e portanto a substância deve ser considerada como não corrosiva.

2.2.2 Ensaio em modelo de pele humana

O valor de DO do controlo negativo representa 100% de viabilidade celular, pelo que os valores obtidos para cada amostra de ensaio poderão ser utilizados para calcular uma percentagem de viabilidade relativa em relação ao controlo negativo. A percentagem que deverá ser considerada para separar os materiais de ensaio corrosivos dos não corrosivos (ou para distinguir entre as diferentes classes de corrosividade) deverão ser claramente definidos no modelo preditivo durante a validação do método, e deve ser demonstrado, no quadro do estudo de validação, que esse valor é apropriado (ver nota 2).

3 Apresentação dos resultados

Relatório de ensaio

O relatório do ensaio deverá incluir, pelo menos, as seguintes informações:

Substância de ensaio:

- identificação, características físicas e, se necessário, físico-químicas. Se forem utilizadas substâncias de referência, deverá ser também apresentada a mesma informação em relação a essas substâncias.

Condições do ensaio:

- procedimento de ensaio utilizado;
- descrição e justificação de eventuais modificações.

Resultados:

- tabelas com os valores de resistência (ensaio TER) ou com as percentagens de viabilidade celular (ensaio em modelo de pele humana) dos materiais de ensaio, dos controlos positivo e negativo e de qualquer produto químico padrão que tenha sido utilizado, incluindo todos os dados relativos aos replicados/repetição de experiências e valores médios;
- descrição de outros efeitos eventualmente observados.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4 Bibliografia

(nota 1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, ATLA, 26, pp. 275-280.

(nota 2) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balis, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzthutter, 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.

(nota 3) Barratt, M. D., Brantom, P. G., Fentem, J. H., Gerner, I., Walker, A. P. & Worth, A. P. (1998), «The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals», Toxicology in Vitro, 12, pp. 471-482.

(nota 4) Oliver, G. J. A., Pemberton, M. A. & Rhodes, C. (1986), «An in vitro skin corrosivity test - modifications and validation», Food & Chemical Toxicology, 24, pp. 507-512.

(nota 5) Botham, P. A., Hall, T. J., Dennett, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D. J. & Gardner, J. (1992), «The skin corrosivity test in vitro: results of an interlaboratory trial», Toxicology in Vitro, 6, pp. 191-194.

(nota 6) Worth, A. P., Fentem, J. H., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J. & Liebsch, M. (1998), «An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion», ATLA, 26, pp. 709-720.

(nota 7) Botham, P. A., Chamberlain, M., Barratt, M. D., Curren, R. D., Esdaile, D. J., Gardner, J. R., Gordon, V. C., Hildebrand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P. & Balls, M. (1995), «A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6», ATLA, 23, pp. 219-255.

FIGURA 1

Dimensões do tubo de PTFE

(ver figura no documento original)

Dimensões do eléctrodo
(ver figura no documento original)

FIGURA 2

Montagem para o ensaio TER em pele de rato
(ver figura no documento original)

ANEXO XII

B.41 Fototoxicidade - ensaio de fototoxicidade - in vitro 3T3 NRU

1 Método

1.1 Introdução

A fototoxicidade é definida como uma reacção tóxica decorrente da primeira exposição da pele a determinadas substâncias químicas, com posterior exposição à luz ou por irradiação da pele na sequência da administração sistémica de uma substância química.

A informação decorrente do ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU é utilizada para definir o potencial fototóxico de uma substância em estudo, ou seja, a existência ou ausência de possíveis riscos associados a uma substância em estudo, por exposição à radiação UV e visível.

Dado que o objectivo toxicológico do ensaio in vitro consiste na determinação da fotocitotoxicidade decorrente da acção combinada de uma substância e de uma radiação, o ensaio permite identificar compostos que exibem fototoxicidade in vivo na sequência da sua administração sistémica e difusão na pele, bem como compostos fotoirritantes na sequência da sua aplicação tópica na pele.

O ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU foi elaborado e validado entre 1992 e 1997 no âmbito de um projecto conjunto UE/COLIPA (ver nota 1) (ver nota 2) (ver nota 3), com o objectivo de estabelecer um método in vitro válido destinado a substituir os diversos ensaios in vivo utilizados. Num seminário da OCDE realizado em 1996 foi recomendada a adopção de uma abordagem sequencial in vitro para avaliar a fototoxicidade (ver nota 4).

Os resultados do ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU foram comparados com os efeitos de fototoxicidade/fotoirritação aguda in vivo em animais e no homem, tendo o ensaio revelado uma excelente previsibilidade dos referidos efeitos. O ensaio não é concebido para detectar outros efeitos nocivos decorrentes da acção combinada das substâncias químicas e a das radiações, nomeadamente a fotogenotoxicidade, a fotoalergia e a fotocarcinogenicidade, embora muitas substâncias químicas que apresentam essas propriedades exibam uma reacção positiva no ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU. O ensaio não é também concebido para avaliar o potencial fototóxico.

O apêndice I apresenta abordagem sequencial para a determinação da fototoxicidade de substâncias químicas.

1.2 Definições

Irradiância: intensidade da radiação ultravioleta (UV) ou visível que incide numa superfície, expressa em W/m² ou mW/cm².

Dose de radiação: quantidade (= intensidade x tempo) de radiação ultravioleta (UV) ou visível que incide numa superfície, expressa em joules (= W x s) por unidade de superfície (por exemplo, J/m² ou J/cm²).

Bandas de comprimentos de onda da radiação UV: as designações recomendadas pela CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) são: UVA (315 nm-400 nm), UVB (280 nm-315 nm) e UVC (100 nm-280 nm). Utilizam-se também outras designações: o limite entre UVB e UVA é frequentemente situado a 320 nm, podendo as radiações UVA subdividir-se em UV-A1 e UV-A2, com uma separação a cerca de 340 nm.

Viabilidade celular: parâmetro que mede a actividade total de uma população celular (por exemplo, absorção do pigmento vital vermelho neutro pelos lisosomas celulares); em função

da variável determinada e do tipo de ensaio realizado, é possível correlacionar a viabilidade celular com o número total e ou a vitalidade das células.

Viabilidade celular relativa: viabilidade celular expressa em relação aos ensaios de controlo negativos (apenas com o solvente) efectuados ao longo do procedimento de ensaio (+UV ou -UV), na ausência da substância em estudo.

Modelo de previsão: algoritmo utilizado para transformar os resultados de um ensaio de toxicidade numa previsão do potencial de toxicidade: No âmbito das presentes directrizes de ensaio, podem utilizar-se os parâmetros PIF e MPE para transformar os resultados do ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU numa previsão do potencial fototóxico.

PIF (photo irritation factor - Factor de fotoirritação): factor obtido por comparação entre duas concentrações citotóxicas igualmente eficazes (EC(índice 50)) da substância em estudo, respectivamente sem (-UV) e com exposição (+UV) a uma dose não citotóxica de radiação UVA/visível.

MPE (mean photo effect - Fotoefeito médio): parâmetro obtido por tratamento matemático do traçado de duas curvas concentração-efeito obtidas, respectivamente, sem (-UV) e com (+UV) exposição a uma dose não citotóxica de radiação UVA/visível.

Fototoxicidade: reacção tóxica aguda decorrente da exposição da pele a determinadas substâncias químicas e sua posterior exposição à luz, ou por irradiação da pele após a administração sistémica de uma substância química.

Fotoirritação: subcategoria do termo «fototoxicidade» utilizada apenas para descrever as reacções fototóxicas da pele decorrentes da exposição, por aplicação tópica ou administração oral, a substâncias químicas. As referidas reacções fototóxicas provocam sempre danos celulares não específicos (do tipo eritema solar).

Fotoalergia: reacção imunológica adquirida, que não ocorre na sequência da primeira exposição à substância química e à radiação, sendo necessário um período de indução de uma ou duas semanas para que se observe reacção cutânea.

Fotogenotoxicidade: reacção genotóxica observada para um parâmetro genético, produzido na sequência da exposição das células a uma dose não genotóxica de radiação UV/visível e a uma substância química não genotóxica.

Fotocarcinogenicidade: carcinogenicidade induzida pela exposição repetida às radiações e a uma substância química. Utiliza-se o termo «fotocarcinogénese» quando o efeito cancerígeno das radiações UV é reforçado pela exposição a uma substância química.

1.3 Substâncias de referência

Além da clorpromacina utilizada para o controlo positivo, que deve ser analisada paralelamente em cada ensaio, recomenda-se a utilização como substâncias de referência no ensaio de fototoxicidade 3T3 NRU de um subconjunto das substâncias químicas utilizadas para o mesmo fim nos ensaios interlaboratoriais (ver nota 1) (ver nota 3) (ver nota 13).

1.4 Considerações preliminares

Existem inúmeras referências aos efeitos fototóxicos de muitas substâncias (ver nota 5) (ver nota 6) (ver nota 7) (ver nota 8). A única característica comum das referidas substâncias consiste na capacidade de absorver a energia luminosa da radiação solar. De acordo com a primeira lei da fotoquímica (lei de Grotthaus-Draper), é necessária a absorção de uma quantidade suficiente de quanta de luz para que se observe fotorreacção. Deste modo, antes de realizar um ensaio biológico em conformidade com as presentes directrizes, deve determinar-se o espectro de absorção no UV/visível da substância em estudo (por exemplo de acordo com a directriz 101 da OCDE). Caso o coeficiente de extinção/absorção molar seja inferior a $10^4 \text{ l x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$, a substância carece de potencial fotorreactivo, não sendo necessário submetê-la ao ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU nem a qualquer outro ensaio biológico para a determinação de efeitos fotoquímicos nocivos (apêndice I).

1.5 Princípio de método

Foram identificados quatro mecanismos mediante os quais a absorção de luz por um cromóforo pode ocasionar uma reacção fototóxica (ver nota 7): todos os referidos mecanismos se traduzem em danos celulares. Deste modo, o ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU baseia-se na comparação da citotoxicidade de uma substância submetida a ensaio com ou sem exposição a uma dose não citotóxica de radiação UVA/visível. No âmbito do ensaio, a citotoxicidade é expressa numa redução, em termos de concentração, da absorção do pigmento vermelho neutro vital [neutral red - NR (ver nota 9)] 24 horas após a administração da substância em estudo e a irradiação.

Efectua-se uma cultura de células Balb/c 3T3 durante 24 horas, até à formação de monocamadas. Para cada substância em estudo, procede-se à pré-incubação, durante 1 hora, de duas placas de 96 alvéolos com oito concentrações diferentes da substância. Expõe-se uma das placas a uma dose não citotóxica de 5 J/cm² UVA (experiência +UV), mantendo-se a outra na obscuridade (experiência -UV). Seguidamente, o meio de tratamento é substituído, em ambas as placas, por um meio de cultura: após uma nova incubação de 24 horas, determina-se a viabilidade celular por análise da absorção do vermelho neutro (neutral red uptake - NRU) durante 3 horas. Calcula-se a viabilidade celular relativa, expressa em percentagem das amostras de controlo isentas da substância em estudo, para cada uma das oito concentrações de ensaio. Para a previsão do potencial fototóxico, comparam-se as reacções, em termos de concentrações, obtidas com (+UV) e sem (-UV) irradiação, em geral ao nível EC(índice 50), ou seja, a concentração que inibe a viabilidade celular em 50% relativamente às amostras de controlo isentas da substância.

1.6 Critérios de qualidade

Sensibilidade das células às radiações UVA - dados de referência: deve comprovar-se periodicamente a sensibilidade das células às radiações UVA. Para tal, as células são inoculadas à densidade utilizada no ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU e irradiam-se as mesmas, no dia seguinte, com uma dose de 1 a 9 J/cm² de radiação UVA. Um dia depois determina-se a viabilidade celular através do ensaio NRU. As células satisfazem os critérios de qualidade se, na sequência da irradiação com 5 J/cm² UVA, a sua viabilidade for superior ou igual a 80% da viabilidade das amostras mantidas na obscuridade. A viabilidade obtida utilizando a dose máxima de radiação UVA de 9 J/cm² não deve ser inferior a 50% da obtida com as amostras mantidas na obscuridade. O processo deve repetir-se aproximadamente em cada 10 passagens celulares.

Sensibilidade das células das amostras de controlo negativas à radiação UVA - ensaio em curso: o ensaio satisfaz os critérios de qualidade se as amostras de controlo negativas [células numa solução salina equilibrada de Earl (earl's balanced salt solution - EBSS) contendo ou não 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) ou 1% de etanol (EtOH)] no ensaio +UVA apresentarem uma viabilidade igual ou superior a 80% da das células não irradiadas, no mesmo solvente, no ensaio paralelo realizado na obscuridade (-UVA).

Viabilidade das amostras de controlo negativas: a densidade óptica absoluta (OD(índice 540 NRU)) determinada no extracto NR das amostras de controlo negativas indica se as 1×10^4 (elevado a 4) células inoculadas por alvéolo apresentam um tempo de replicação normal no decurso dos dois dias do ensaio. O ensaio satisfaz os critérios se a densidade óptica média (OD(índice 540 NRU)) das amostras de controlo não tratadas for igual ou superior a 0,2.

Controlo positivo: paralelamente a cada ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU deve efectuar-se um ensaio com uma substância fototóxica conhecida. Recomenda-se a utilização de clorpromacina (CPZ), substância de controlo positivo utilizada no estudo de validação EU/COLIPA. Foram definidos os seguintes critérios de aceitação para o uso de CPZ em conformidade com o protocolo normalizado do ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU: CPZ irradiada (+UVA), EC(índice 50) = 0,1 (mg/ml) a 2,0 (mg/ml); CPZ não irradiada (-

UVA), EC(índice 50) = 7,0 (m)g/ml a 90,0 (m)g/ml. O factor de fotoirritação (PIF), ou seja, a variação da EC(índice 50) deve ser de, pelo menos, 6.

Em vez da CPZ podem utilizar-se nos referidos controlos positivos paralelos outras substâncias fototóxicas conhecidas, adequadas à categoria química ou às características de solubilidade da substância em estudo. Neste caso, devem definir-se como critérios de aceitação para o ensaio, com base nos dados acumulados, os intervalos dos valores da EC(índice 50) e o PIF ou o MPE.

1.7 Descrição do método

1.7.1 Preparação

1.7.1.1 Células

Recomenda-se a utilização de uma linhagem celular permanente de fibroblastos de rato - Balb/c 3T3, clon 31 - proveniente do ATCC ou ECACC, idêntica à utilizada no ensaio de validação. Podem também obter-se resultados satisfatórios por recurso a outras células ou linhagens celulares, aplicando o mesmo protocolo de ensaio, se as condições de cultura forem adequadas às necessidades específicas das células; todavia, nesse caso, é necessário demonstrar a equivalência.

Deve comprovar-se regularmente que as células não estão contaminadas por micoplasmas, devendo as mesmas apenas ser utilizadas se os resultados das referidas comprovações forem satisfatórios.

Uma vez que a sensibilidade das células às radiações UVA pode aumentar com o número de passagens, devem utilizar-se células Balb/c 3T3 que tenham sido objecto do menor número possível de passagens, preferivelmente menos de 100. Deve comprovar-se periodicamente a sensibilidade das células Balb/c 3T3 às radiações UVA por recurso ao procedimento de controlo de qualidade descrito nas presentes directrizes.

1.7.1.2 Meios e condições de cultura

Devem utilizar-se meios de cultura e condições de incubação adequados às passagens celulares comuns e ao procedimento de ensaio. No caso das células Balb/c 3T3, recomenda-se o uso de DMEM enriquecido com 10% de soro de bovino recém-nascido, 4 mM de glutamina, penicilina e estreptomicina, incubado a 37°C numa atmosfera húmida com 7,5% de CO(índice 2). É particularmente importante que as condições de cultura celular permitam manter o ciclo celular nos valores normais das células ou da linhagem celular utilizadas.

1.7.1.3 Preparação das culturas

Inoculam-se num meio de cultura de densidade adequada células provenientes de culturas-mãe congeladas, efectuando-se pelo menos uma subcultura antes de utilizá-las no ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU.

Para o ensaio de fototoxicidade, inoculam-se as células num meio de cultura de densidade tal que impeça a confluência das culturas antes do termo do ensaio, ou seja, aquando da determinação da viabilidade celular 48 horas após a inoculação das células. No caso das células Balb/c 3T3 cultivadas em placas de 96 alvéolos, recomenda-se uma densidade de 1 x 10⁴ (elevado a 4) células por alvéolo.

Para cada substância em estudo, inoculam-se as células de modo idêntico em duas placas diferentes de 96 alvéolos, mantendo-se as condições de cultura ao longo de todo o ensaio, excepto durante o período de irradiação de uma das substâncias (+radiação UVA/visível), enquanto que a outra se mantém na obscuridade (-radiação UVA/visível).

1.7.1.4 Activação metabólica

Embora, de modo geral, seja necessário recorrer a sistemas de activação metabólica para todos os ensaios in vitro de previsão do potencial genotóxico ou carcinogénico, no domínio da fototoxicologia não se conhece ainda qualquer substância química que necessite de uma transformação metabólica para actuar como fototoxina in vivo ou in vitro. Por conseguinte,

não se considera necessário nem cientificamente justificado utilizar um sistema de activação metabólica no presente ensaio.

1.7.1.5 Substância em estudo - Preparação

As substâncias devem preparar-se imediatamente antes da utilização, excepto se os dados de estabilidade mostrarem que é possível armazená-las. Caso seja provável a ocorrência de fotodegradação rápida, pode ser necessário preparar as referidas substâncias à luz vermelha.

As substâncias em estudo são dissolvidas em soluções-tampão salinas, tais como uma solução salina equilibrada de Earl (EBSS) ou uma solução-tampão salina de fosfatos (phosphate buffered saline - PBS), que não devem conter componentes proteicos nem corantes indicadores de pH que absorvam a luz, de modo a evitar interferências durante a irradiação.

As substâncias de ensaio fracamente solúveis em água devem dissolver-se em solventes adequados numa concentração 100 vezes superior à concentração final desejada, diluindo-se de seguida na proporção 1:100 com a solução-tampão salina. Caso se utilize um solvente, a sua concentração volúmica deve permanecer constante (1%) em todas as culturas, isto é, tanto nas amostras de controlo negativo como nas amostras da substância em estudo em todas as concentrações.

Recomenda-se o uso do dimetilssulfóxido (DMSO) e do etanol (EtOH) como solventes. Podem utilizar-se outros solventes de citotoxicidade reduzida (por exemplo, acetona), devendo contudo avaliar-se devidamente as suas propriedades específicas, nomeadamente a possibilidade de reagir com a substância em estudo, de reduzir o efeito fototóxico ou de captar radicais.

Se necessário, pode recorrer-se a um agitador mecânico, a um banho de ultra-sons e ou ao aquecimento a 37°C para facilitar a dissolução.

1.7.1.6 Irradiação com UV - Preparação

Fonte de radiação: a escolha de uma fonte de radiação e de uma filtração adequadas constitui o factor determinante dos ensaios de fototoxicidade. As regiões do visível e do UVA encontram-se, em geral, associadas à fotossensibilização (ver nota 7) (ver nota 10), enquanto que a gama do UVB possui menor importância neste domínio, apresentando em contrapartida uma elevada citotoxicidade directa que é multiplicada por 1000 entre 313 nm e 280 nm (ver nota 11). Os critérios de selecção da fonte de radiação adequada devem incluir o requisito essencial da emissão de comprimentos de onda que a substância em estudo absorve: por outro lado, a dose de luz (passível de ser obtida num período razoável) deve ser suficiente para detectar os fotossensibilizadores conhecidos. Além disso, os comprimentos de onda e as doses utilizadas não devem causar danos desnecessários ao sistema em estudo, nomeadamente devido à emissão de calor (região do infravermelho).

Considera-se que a melhor fonte de luz é produzida por simuladores de radiação solar, que utilizam arcos de xénon ou arcos de mercúrio dopado-halogeneto de metal. Estes últimos apresentam a vantagem de emitir menos calor e de ser mais económicos, mas não reproduzem exactamente a luz solar. Dado que todos os simuladores de radiação solar emitem quantidades consideráveis de radiação UVB, devem utilizar-se filtros adequados para atenuar os respectivos comprimentos de onda altamente citotóxicos.

No ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU deve utilizar-se um espectro de irradiância praticamente isento de UVB (UVA:UVB ~ 1:20). A referência 3 inclui um exemplo da distribuição da irradiância espectral do simulador de radiação solar filtrada utilizado na validação do ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU (ver nota 3).

Dosimetria: antes de cada ensaio de fototoxicidade deve comprovar-se a intensidade da radiação (irradiância) por recurso a um medidor de UV de banda larga adequado, previamente calibrado em função da fonte de radiação. Deve comprovar-se o desempenho do aparelho, recomendando-se para tal a utilização de um segundo medidor de UV de referência do mesmo tipo, calibrado do mesmo modo. A utilização, a intervalos superiores, de um

espectrorradiômetro para medir a irradiância espectral da fonte de luz filtrada e comprovar a calibração do medidor de UV de banda larga constitui a solução ideal, embora a manipulação dos instrumentos em causa necessite de pessoal devidamente qualificado.

O ensaio de validação mostrou que a dose de 5 J/cm² (UVA) não apresenta citotoxicidade para as células Balb/c 3T3, sendo suficientemente potente para activar as substâncias químicas fracamente fototóxicas. Para obter 5 J/cm² no período de 50 minutos, deve ajustar-se a irradiância a 1,666 mW/cm². Caso se utilize outra linhagem celular ou outra fonte de radiação, pode ser necessário adaptar ligeiramente a dose de raios UVA de um modo que não danifique as células e seja suficiente para detectar as fototoxinas de referência. A duração da exposição é calculada de acordo com a expressão:

$$t \text{ (min)} = [(dose \text{ de irradiação (J/cm}^2) \times 1000) / (irradiância \text{ (mW/cm}^2) \times 60)] \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W seg})$$

1.7.2 Condições de ensaio

A concentração máxima da substância em estudo não deve exceder 100 mg/ml, uma vez que todas as substâncias fototóxicas foram detectadas a concentrações inferiores: além disso, a concentrações superiores, aumenta a incidência de falsos resultados positivos (ver nota 13). O pH da concentração mais elevada da substância em estudo deve ser adequado (compreendido entre 6,5 e 7,8).

Devem determinar-se de forma adequada, em ensaios prévios, as gamas de concentração da substância em estudo com (+UVA) e sem (-UVA) irradiação. A gama e o intervalo de uma série de concentrações devem ajustar-se de modo que as curvas concentração-resposta sejam fundamentadas experimentalmente. Devem utilizar-se concentrações em progressão geométrica, com um factor de diluição constante.

1.7.3 Procedimento (ver nota 1)

1.7.3.1 Primeiro dia

Prepara-se uma suspensão de 1×10^5 (elevado a 5) células/ml no meio de cultura e colocam-se 100 ml de meio de cultura apenas nos alvéolos periféricos de uma placa de microtitulação de 96 alvéolos (= ensaios em branco). Nos restantes alvéolos colocam-se 100 ml de suspensão de 1×10^5 (elevado a 5) células/ml (= 1×10^4 (elevado a 4) células/alvéolo). Preparam-se duas placas com cada substância em estudo, destinando-se uma a determinar a citotoxicidade (-UVA) e a outra a fotocitotoxicidade (+UVA).

Incubam-se as células durante 24 horas (7,5% CO₂ (índice 2), 37°C) até à formação de uma monocamada semiconfluente. O referido período de incubação permite a recuperação, a aderência e o crescimento exponencial das células.

1.7.3.2 Segundo dia

Após a incubação, decanta-se o meio de cultura celular e efectuam-se, por alvéolo, duas lavagens com 150 (μ)l de EBSS/PBS. Adicionam-se 100 (μ)l de EBSS/PBS com a concentração adequada da substância em estudo ou, no caso das amostras de controlo negativo, apenas solvente. Adicionam-se oito concentrações diferentes da substância em estudo. Incubam-se as células com a substância em estudo durante 60 minutos, na obscuridade (7,5% CO₂ (índice 2), 37°C).

Na componente (+UVA) do ensaio, irradiam-se as células durante 50 minutos, à temperatura ambiente, através da cobertura da placa de 96 alvéolos, com uma dose de 1,7 mW/cm² UVA (= 5 J/cm²). Utilizar um ventilador para evitar a condensação de água sob a cobertura. Para o ensaio (-UVA), colocar na obscuridade a segunda série de placas, à temperatura ambiente, durante 50 minutos (= tempo de exposição aos raios UVA).

Decanta-se a solução de ensaio, efectuando duas lavagens com 150 ml de EBSS/PBS. Substitui-se a EBSS/PBS pelo meio de cultura e incuba-se (7,5% CO₂ (índice 2), 37°C) até ao dia seguinte (18-22 horas).

1.7.3.3 Terceiro dia

Análise microscópica:

Examinam-se as células num microscópio com dispositivo de contraste de fase. Registam-se as alterações morfológicas das células devidas aos efeitos citotóxicos da substância em estudo. A comprovação em causa é recomendada com o objectivo de excluir erros experimentais, embora as observações efectuadas no seu âmbito não sejam utilizadas para avaliar a citotoxicidade nem a fototoxicidade.

Ensaio de absorção do vermelho neutro:

Lavam-se as células com 150 (ml) de EBSS/PBS pré-aquecida. Remove-se a solução de lavagem sacudindo ligeiramente. Adicionam-se 100 (ml) de meio com NR e incuba-se durante 3 horas a 37°C, em atmosfera húmida com 7,5% CO₂ (índice 2).

Após a incubação, elimina-se o meio com NR e lavam-se as células com 150 ml de EBSS/PBS. Decanta-se e enxuga-se totalmente a EBSS/PBS. (Alternativa: centrifugar a placa invertida.)

Adicionam-se exactamente 150 (ml) de solução de desorção do NR (solução de etanol/ácido acético recentemente preparada).

Agita-se rapidamente a placa num agitador de microplacas durante 10 minutos, até que o NR seja extraído das células e forme uma solução homogénea.

Mede-se a densidade óptica do extracto de NR a 540 nm num espectrofotómetro, utilizando como referência os ensaios em branco. Armazenam-se os dados num ficheiro de formato adequado (por exemplo, ASCII), com vista ao seu tratamento posterior.

2 Resultados

2.1 Qualidade e quantidade dos resultados

Os dados devem permitir uma análise significativa das respostas obtidas para cada concentração, com e sem irradiação UVA/visível. Caso se observe fototoxicidade, tanto a gama de concentrações como o intervalo entre cada concentração devem ser estabelecidos de modo que permitam adaptar o traçado de uma curva aos dados experimentais. Uma vez que a substância em estudo pode não produzir efeitos citotóxicos à concentração-limite de 100 mg/ml definida para o ensaio realizado na obscuridade (-UVA), exibindo todavia uma elevada citotoxicidade no ensaio com irradiação (+UVA), pode ser necessário utilizar em cada componente do ensaio gamas de concentração de magnitude diversa, de modo a obter resultados de qualidade adequada. Caso não se observe citotoxicidade em nenhuma das componentes do ensaio (-UVA e +UVA), bastará utilizar concentrações separadas por um intervalo apreciável, até à concentração máxima.

Não é necessário comprovar um resultado claramente positivo, repetindo o ensaio. Os resultados claramente negativos não necessitam também de comprovação caso o ensaio tenha sido realizado com concentrações suficientemente altas. Nessas circunstâncias, bastará realizar um ensaio principal e um ou vários ensaios prévios com o objectivo de definir as gamas de concentração.

Os ensaios cujos resultados se situem no limite do modelo de predição devem ser repetidos para fins comprovativos.

Caso se considere necessário repetir o ensaio, pode ser importante alterar as condições experimentais de modo a obter um resultado inequívoco. Neste contexto, a preparação das soluções da substância constitui um aspecto fundamental. A alteração das referidas condições, expressa, por exemplo, na utilização de co-solventes, na trituração da amostra ou na utilização de um banho de ultra-sons, pode, pois, revelar-se fundamental. Como alternativa, pode também alterar-se o período da incubação antes da irradiação: no caso de substâncias instáveis em água, pode ser conveniente reduzir o referido período.

2.2 Tratamento dos resultados

Se possível, deve determinar-se a concentração de substância em estudo que induz uma inibição de 50% da absorção celular de vermelho neutro (EC₅₀ (índice 50)). Para tal, pode aplicar-se aos resultados de concentração-resposta qualquer método de regressão não linear

adequado (de preferência, uma função de Hill ou uma regressão logística) ou outros métodos de ajustamento (ver nota 14). Antes de utilizar um determinado valor de EC(índice 50) nos cálculos posteriores, deve comprovar-se devidamente a qualidade do ajustamento. Podem também utilizar-se no cálculo do valor de EC(índice 50) métodos de ajustamento gráfico. Nesse caso, recomenda-se a utilização de papel probabilístico (eixo x: log, eixo y: probit), uma vez que, frequentemente, a função concentração-resposta se torna praticamente linear na sequência da transformação.

2.3 Avaliação dos resultados (modelos de previsão)

2.3.1 Modelo de previsão - versão 1: factor de fotoirritação (PIF)

Se, tanto em presença (+UVA) como na ausência (-UVA) de radiação, se obtiverem curvas concentração-resposta completas, pode calcular-se o factor de fotoirritação (PIF) por recurso à fórmula seguinte:

$$a) \text{ PIF} = [\text{EC}(\text{índice } 50)(-UV)] / [\text{EC}(\text{índice } 50)(+UV)]$$

A obtenção de um valor $\text{PIF} < 5$ traduz a ausência de potencial fototóxico, enquanto que um $\text{PIF} \geq 5$ traduz a existência de potencial fototóxico.

Se uma substância se revelar citotóxica quando irradiada (+UVA) mas não na ausência de irradiação (-UVA), não é possível calcular o PIF, embora o referido resultado indique a existência de potencial fototóxico. Em tais casos, pode calcular-se um valor $> \text{PIF}$ se o ensaio de citotoxicidade (-UV) tiver decorrido até à concentração de ensaio máxima ($C(\text{índice máx})$), valor que se utiliza no cálculo de $> \text{PIF}$:

$$b) > \text{PIF} = [C(\text{índice máx})(-UV)] / [C(\text{índice máx})(+UV)]$$

Caso se obtenha apenas um valor $> \text{PIF}$, qualquer valor superior a 1 traduz um potencial fototóxico.

Se não for possível calcular a $\text{EC}(\text{índice } 50)(-UV)$ nem a $\text{EC}(\text{índice } 50)(+UV)$ porque a substância não produz efeitos citotóxicos mesmo à concentração de ensaio máxima, tal significa que a substância não possui potencial fototóxico. Nessas condições, utiliza-se um $\text{PIF} = *1$ teórico para caracterizar o resultado.

$$c) \text{ PIF} = *1 = [C(\text{índice máx})(-UV)] / [C(\text{índice máx})(+UV)]$$

Caso se obtenha apenas um valor « $\text{PIF} = *1$ », o ensaio traduz a ausência de potencial fototóxico.

Nos casos b) e c), devem tomar-se na devida conta as concentrações obtidas no ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU aquando da previsão do potencial fototóxico.

2.3.2 Modelo de previsão - versão 2: fotoefeito médio (MPE)

Como alternativa, pode utilizar-se uma nova versão do modelo de previsão do potencial fototóxico elaborada com base nos dados obtidos no estudo de validação EU/COLIPA (ver nota 15) e comprovada num ensaio «cego» realizado no âmbito de um estudo posterior relativo à fototoxicidade in vitro de substâncias utilizadas como filtros de UV (ver nota 13). Este modelo permite superar a limitação do modelo baseado no PIF nos casos em que não é possível obter um valor de $\text{EC}(\text{índice } 50)$. O modelo utiliza o fotoefeito médio (MPE), que constitui um parâmetro baseado na comparação das curvas concentração-resposta, na sua totalidade. A Universidade Humboldt de Berlim elaborou um programa informático especial para a aplicação do modelo MPE, que pode obter-se gratuitamente.

2.4 Interpretação dos resultados

A obtenção de um resultado positivo no ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU ($\text{PIF} \geq 5$ ou $\text{MPE} \geq 0,1$) indica que a substância em estudo apresenta potencial fototóxico. Se o referido resultado foi obtido com concentrações inferiores a 10 mg/ml, é provável que a substância em estudo apresente também efeitos fototóxicos em diversas condições de exposição in vivo. Caso se obtenha um resultado positivo apenas com a concentração de ensaio máxima de 100 mg/ml, pode ser necessário, para avaliar o perigo ou o poder fototóxico, ter em conta outros aspectos, tais como a penetração e a absorção cutâneas e a

possível acumulação da substância na pele, ou submeter a substância a outro tipo de ensaios, com o objectivo de confirmar os resultados, utilizando, por exemplo, um modelo de pele humana in vitro.

A obtenção de um resultado negativo no ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU ($PIF < 5$ ou $MPE < 0,1$) indica que a substância em estudo não apresenta efeitos fototóxicos nas células de mamífero cultivadas nas condições em causa. Se for possível submeter a substância a ensaio até à concentração máxima de 100 mg/ml, a obtenção de um resultado negativo indica que a mesma não possui de potencial fototóxico, sendo improvável que produza efeitos fototóxicos in vivo. Nos casos em que se obtenham reacções tóxicas idênticas ($EC(\text{índice } 50) + UV$ e $EC(\text{índice } 50) - UV$) com concentrações inferiores, devem interpretar-se os dados do mesmo modo. Todavia, caso não se observe toxicidade (+UV e -UV) e a solubilidade em água da substância em estudo tenha limitado as concentrações utilizadas a menos de 100 mg/ml, pode questionar-se a compatibilidade da substância com o método de ensaio, devendo encarar-se a possibilidade de realizar um ensaio de confirmação (por exemplo, com um modelo de pele in vitro ou ex vivo, ou um ensaio in vivo).

3 Relatório

Relatório do ensaio

O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Substância em estudo:

- dados de identificação e número CAS, se conhecido;
- natureza física e pureza;
- propriedades físico-químicas relevantes para a realização do estudo;
- estabilidade e fotoestabilidade, se conhecidas.

Solvente:

- justificação da escolha do solvente;
- solubilidade da substância em estudo no solvente;
- percentagem de solvente presente no meio de tratamento (EBSS ou PBS).

Células:

- tipo e proveniência das células;
- ausência de micoplasma;
- número de passagens celulares, se conhecido.- sensibilidade das células à radiação UVA, determinada com o equipamento de irradiação utilizado no ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU.

Condições de ensaio a) - incubação antes do tratamento e após o mesmo:

- tipo e composição do meio de cultura;
- condições de incubação (concentração de CO(índice 2), temperatura e humidade);
- duração da incubação (tratamento prévio e posterior).

Condições de ensaio b) - tratamento com a substância:

- fundamentação da escolha das concentrações da substância em estudo utilizadas nos ensaios com e sem irradiação UV/visível;
- caso a substância em estudo seja fracamente solúvel e não citotóxica, fundamentação da escolha da maior concentração utilizada;
- tipo e composição do meio de tratamento (solução-tampão salina);
- duração do tratamento químico.

Condições de ensaio c) - irradiação:

- fundamentação da escolha da fonte de radiação utilizada;
- características da irradiância espectral da fonte de radiação;
- características de transmissão/absorção do filtro ou filtros utilizados;
- características do radiómetro e condições de calibração;
- distância entre a fonte de radiação e o sistema de ensaio;

- irradiância UVA à referida distância, expressa em mW/cm²;
- duração da exposição à radiação UV/visível;
- dose de radiação UVA (irradiância x tempo), expressa em J/cm²;
- temperatura utilizada para as culturas celulares irradiadas e as culturas mantidas na obscuridade.

Condições de ensaio d) - ensaio NRU:

- composição do meio NR;
- duração da incubação em NR;
- condições de incubação (concentração de CO(índice 2), temperatura e humidade);
- condições de extracção do NR (agente de extracção, duração);
- comprimento de onda utilizado para a leitura espectrofotométrica da densidade óptica do NR;
- segundo comprimento de onda (referência), se aplicável;
- substância utilizada para o ensaio em branco do espectrofotómetro, se aplicável.

Resultados:

- viabilidade celular obtida para cada concentração da substância em estudo, expressa em percentagem da viabilidade média dos controlos;
- curvas concentração-resposta (concentração da substância em estudo - viabilidade celular relativa), obtidas nos ensaios +UVA e -UVA paralelos;
- análise dos dados provenientes das curvas concentração-resposta: se possível, cálculo automático/cálculo do valor de EC(índice 50) (+UVA) e EC(índice 50) (-UVA);
- comparação das duas curvas concentração-resposta obtidas com e sem irradiação UVA/visível, calculando o factor de fotoirritação (PIF) ou o fotoefeito médio (MPE).
- classificação do potencial fototóxico;- critérios de aceitação do ensaio a) - controlo negativo paralelo:
- viabilidade absoluta (densidade óptica do extracto de NR) das células irradiadas e as não irradiadas;
- dados de referência do controlo negativo, média e desvio padrão;
- critérios de aceitação do ensaio b) - controlo positivo paralelo;
- EC(índice 50) (+UVA), EC(índice 50) (-UVA) e PIF da substância de controlo positivo;
- dados de referência da substância de controlo positivo: EC(índice 50) (+UVA), EC(índice 50) (-UVA) e PIF, média e desvio padrão.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4 Bibliografia

(nota 1) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H. G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994), EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro*, 8, pp. 793-796.

(nota 2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an in vitro test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA*, 26, pp. 7-8.

(nota 3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA «In vitro phototoxicity» validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, pp. 305-327.

(nota 4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.

(nota 5) Lovell, W. W. (1993), A scheme for in vitro screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro*, 7, pp. 95-102.

(nota 6) Santamaria, L., and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry*, vol. 3, part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, pp. XI-XXXV.

(nota 7) Spielmann, H., Lovell, W. W., Hölzle, E., Johnson, B. E., Mauren, T., Miranda, M. A., Pape, W. J. W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994), In vitro phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, *ATLA*, 22, pp. 314-348.

(nota 8) Spikes, J. D. (1989), *Photosensitization, The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, pp. 79-110.

(nota 9) Borenfreund, E., and Puerner, J. A. (1985), Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters*, 24, pp. 119-124.

(nota 10) Lambert, L. A., Warner, W. G., and Kornhauser, A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th edition, pp. 515-530.

(nota 11) Tyrrell, R. M., and Pidoux, M. (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research*, 47, pp. 1825-1829.

(nota 12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project «in vitro Photoirritation».

(nota 13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU In Vitro Phototoxicity Test, *ATLA*, 26, pp. 679-708.

(nota 14) Holzhütter, H. G., and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems*, 3, pp. 127-138.

(nota 15) Holzhütter, H. G. (1997), A general measure of in vitro phototoxicity derived from pairs of doseresponse curves and its use for predicting the in vivo phototoxicity of chemicals, *ATLA*, 25, pp. 445-462.

(nota 1) A referência bibliográfica 12 contém informações complementares.

APÊNDICE

Papel do ensaio de fototoxicidade 3T3 NRU numa abordagem sequencial dos ensaios de fototoxicidade de substâncias químicas

(ver figura no documento original)

ANEXO XIII

«ANEXO VI

Critérios gerais de classificação e de rotulagem das substâncias e preparações perigosas

Índice

1 Introdução geral.

2 Classificação com base nas propriedades físico-químicas:

2.1 Introdução.

2.2 Critérios para a classificação, escolha de símbolos, indicação de perigos e escolha de frases indicadoras de riscos:

2.2.1 Explosivo.

2.2.2 Comburente.

- 2.2.3 Extremamente inflamável.
- 2.2.4 Facilmente inflamável.
- 2.2.5 Inflamável.
- 2.2.6 Outras propriedades físico-químicas.
- 3 Classificação com base nas propriedades toxicológicas:
 - 3.1 Introdução.
 - 3.2 Critérios para a classificação, escolha de símbolos, indicação de perigos e escolha de frases indicadoras de riscos:
 - 3.2.1 Muito tóxico.
 - 3.2.2 Tóxico.
 - 3.2.3 Nocivo.
 - 3.2.4 Comentários relativos à utilização da frase R48.
 - 3.2.5 Corrosivo.
 - 3.2.6 Irritante.
 - 3.2.7 Sensibilizante.
 - 3.2.8 Outras propriedades toxicológicas.
- 4 Classificação com base em efeitos específicos na saúde humana:
 - 4.1 Introdução.
 - 4.2 Critérios para a classificação, indicação de perigos e escolha de frases indicadoras de riscos:
 - 4.2.1 Substâncias carcinogénicas.
 - 4.2.2 Substâncias mutagénicas.
 - 4.2.3 Substâncias com efeitos tóxicos na reprodução.
 - 4.2.4 Processo para a classificação de preparações.
- 5 Classificação com base em efeitos no ambiente:
 - 5.1 Introdução.
 - 5.2 Critérios para a classificação, indicação de perigos e escolha de frases indicadoras de riscos:
 - 5.2.1 Ambiente aquático.
 - 5.2.2 Ambiente não aquático.
- 6 Escolha das recomendações de prudência:
 - 6.1 Introdução.
 - 6.2 Recomendações de prudência relativas a substâncias e preparações.
- 7 Proposta de rotulagem.
- 8 Casos especiais: substâncias:
 - 8.1 Garrafas para gases transportáveis.
 - 8.2 Garrafas para gases destinadas ao propano, butano ou gás de petróleo liquefeito (GPL).
 - 8.3 Metais numa forma maciça.
 - 8.4 Substâncias classificadas com a frase R65.
- 9 Casos especiais: preparações:
 - 9.1 Preparações gasosas (misturas de gases).
 - 9.2 Garrafas para gases destinadas a preparações com propano, butano ou gás de petróleo liquefeito (GPL) a que foram adicionados odorizantes.
 - 9.3 Ligas, preparações com polímeros e preparações com elastómeros.
 - 9.4 Preparações classificadas com a frase R65.
 - 9.5 Peróxidos orgânicos.
- 1 Introdução geral
 - 1.1 O objectivo da classificação é identificar todas as propriedades toxicológicas, físico-químicas, e ecotoxicológicas das substâncias e as propriedades toxicológicas e físico-químicas das preparações que possam representar um risco durante a manipulação ou

utilização normais. Identificada qualquer propriedade perigosa, a substância ou preparação deve ser rotulada de modo que os perigos sejam indicados, a fim de proteger o utilizador, o público em geral e o ambiente.

1.2 O presente anexo estabelece os princípios gerais orientadores da classificação e rotulagem das substâncias e preparações referidas no artigo 5.º do presente Regulamento e no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, bem como noutra legislação relevante relativa a preparações perigosas.

Destina-se a todas as pessoas (produtores, importadores e autoridades nacionais) envolvidas nos processos de classificação e rotulagem de substâncias e preparações perigosas.

1.3 As disposições do presente Regulamento e do Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, têm por objectivo pôr à disposição do público em geral e dos trabalhadores um instrumento fundamental capaz de fornecer as informações essenciais relativas às substâncias e preparações perigosas. O rótulo chama a atenção das pessoas que manipulam ou utilizam essas substâncias e preparações para os perigos inerentes a alguns desses materiais.

O rótulo também pode servir para chamar a atenção para informações mais completas sobre o produto, relativas a segurança e utilização, apresentadas noutras formas.

1.4 O rótulo deve atender a todos os perigos potenciais relacionados com a manipulação e utilização normais das substâncias e preparações perigosas, na forma em que são colocadas no mercado mas não necessariamente noutras formas possíveis de utilização final, por exemplo diluídas. Os perigos mais graves são realçados por símbolos, e tanto esses perigos como os que decorrem de outras propriedades perigosas são especificados em frases normalizadas indicadoras de riscos. Por outro lado, com as recomendações de prudência formulam-se conselhos relativos às precauções a tomar.

No caso das substâncias, a informação é completada pela sua designação de acordo com uma nomenclatura química reconhecida internacionalmente, de preferência a designação que é utilizada no Inventário Europeu das Substâncias Químicas Existentes no Mercado (EINECS) ou na Lista Europeia das Substâncias Químicas Notificadas (ELINCS), pelo número CE e pela menção do nome, morada e número de telefone da pessoa estabelecida na Comunidade e responsável pela colocação da substância no mercado.

No caso das preparações, a informação é completada pela designação ou pelo nome comercial da preparação, pela designação química das substâncias que a compõem, nos termos do Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, e pela indicação do nome, morada e número de telefone da pessoa estabelecida na Comunidade e responsável pela colocação da preparação no mercado.

1.5 O Decreto-Lei n.º 82/95, de 22 de Abril, e o presente Regulamento estipulam que os produtores, distribuidores e importadores de substâncias perigosas que figurem no EINECS mas que ainda não constem no anexo I, devem ser obrigados a proceder a investigações que os levem a tomar conhecimento dos dados relevantes disponíveis relativos às propriedades dessas substâncias. Com base nessas informações, devem embalar e rotular provisoriamente as referidas substâncias em questão, de acordo com as regras estabelecidas no n.º 3 do artigo 2.º do Decreto-Lei n.º 82/95, de 22 de Abril, nos artigos 17.º a 20.º do presente Regulamento e com os critérios do anexo VI.

1.6 Em relação às substâncias, os dados necessários para a classificação e rotulagem podem ser obtidos da seguinte forma:

a) No que diz respeito às substâncias relativamente às quais são exigidas as informações especificadas no anexo VII, o «dossier de base» inclui a maioria dos dados necessários para a

classificação e rotulagem. Esta classificação e rotulagem serão revistas, se for caso disso, quando se dispuser de novas informações (anexo VIII);

b) No que diz respeito a outras substâncias (por exemplo, as substâncias referidas no ponto 1.5), os dados necessários para a classificação e rotulagem podem ser, se for caso disso, obtidos de várias fontes, tais como: resultados de ensaios anteriores, informações exigidas pela regulamentação internacional sobre o transporte de matérias perigosas, informações provenientes de trabalhos de referência e da bibliografia e informações baseadas na experiência prática. Podem também ser tidos em conta, sempre que adequado, resultados de relações estrutura-actividade validados, bem como pareceres de peritos.

Em relação às preparações, os dados necessários para a classificação e rotulagem podem ser obtidos da seguinte forma:

a) No que respeita aos dados físico-químicos, por aplicação dos métodos especificados no anexo V. No caso das preparações gasosas, pode ser utilizado um método de cálculo da inflamabilidade e das propriedades oxidantes (v. capítulo 9);

b) No que respeita aos dados relativos aos efeitos na saúde:

- por aplicação dos métodos especificados no anexo V e ou por aplicação do método convencional referido na subsecção III, artigos 12.º ao 17.º, da Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, na redacção que lhe foi dada pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, ou, no caso da frase R65, pela aplicação das normas especificadas em 3.2.3;

- no entanto, tratando-se da avaliação de propriedades cancerígenas, mutagénicas e de toxicidade para a reprodução, aplicar-se-á o método convencional referido na subsecção III, artigos 18.º ao 20.º, da Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, na redacção que lhe foi dada pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho.

Nota relativa à realização de ensaios com animais

A realização de ensaios com animais para a obtenção de dados experimentais está sujeita às disposições do Decreto-Lei n.º 129/92, de 6 de Julho, sua regulamentação e sucessivas alterações, relativo à protecção dos animais para fins experimentais.

1.7 Aplicação dos critérios do guia:

A classificação deve abranger as propriedades toxicológicas e físico-químicas das substâncias e preparações e, para além disso, as propriedades ecotoxicológicas das substâncias.

A classificação das substâncias e preparações é feita com base nos critérios dos capítulos 2 a 4 e, no caso das substâncias, no capítulo 5 do presente anexo. Devem ser tidos em conta todos os tipos de perigos. Por exemplo, a classificação de acordo com o ponto 3.2.1 não implica que parágrafos como o 3.2.2 ou 3.2.4 possam ser ignorados.

A escolha do(s) símbolo(s) e da(s) frase(s) indicadora(s) de risco é feita com base na classificação, de modo a garantir que a natureza dos perigos potenciais identificados na classificação se encontre expressa no rótulo.

Não obstante os critérios definidos nos pontos 2.2.3, 2.2.4 e 2.2.5, as substâncias e preparações na forma de aerossóis estão sujeitas aos critérios de inflamabilidade especificados no Decreto-Lei n.º 108/92, de 2 de Junho, regulamentado pela Portaria n.º 778/92, de 10 de Agosto, na sua actual redacção.

1.7.1 Definições:

Por «substâncias» entendem-se os elementos químicos e seus compostos no estado natural ou tal como são obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e qualquer impureza proveniente do processo de produção, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afectar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição.

Uma substância pode ser quimicamente muito bem definida (por exemplo, a acetona) ou ser uma mistura complexa de componentes de composições variáveis (por exemplo, os destilados

aromáticos). No caso de algumas substâncias complexas, já foram identificados alguns dos seus componentes individuais.

Por «preparações» entendem-se as misturas ou soluções constituídas por duas ou mais substâncias.

1.7.2 Aplicação dos critérios do guia às substâncias:

Os critérios orientadores definidos no presente anexo são directamente aplicáveis sempre que os dados em questão tenham sido obtidos por métodos de ensaio comparáveis aos descritos no anexo V. Nos outros casos, os dados disponíveis devem ser avaliados por comparação dos métodos de ensaio utilizados com os indicados no anexo V e com as regras especificadas no presente anexo para a determinação da classificação e da rotulagem adequadas.

Em determinados casos poderão surgir dúvidas quanto à aplicação dos critérios relevantes, em especial sempre que estes últimos necessitem da apreciação de peritos. Em tais casos, o produtor, o distribuidor ou o importador devem classificar e rotular provisoriamente a substância com base na avaliação dos dados disponíveis por uma pessoa competente.

Sem prejuízo do n.º 2 do artigo 18.º, nos casos em que, na sequência da aplicação do procedimento supra, subsistam preocupações sobre possíveis incoerências, deve apresentar-se uma proposta de inclusão da classificação provisória no anexo I. A proposta deve ser apresentada a um Estado membro e ser acompanhada de dados científicos adequados (v. também o ponto 4.1).

Pode adoptar-se um procedimento análogo sempre que existam informações que suscitem dúvidas quanto à adequação de uma entrada incluída no anexo I.

1.7.2.1 Classificação de substâncias que contenham impurezas, aditivos ou componentes individuais:

Quando tenham sido identificados impurezas, aditivos ou componentes individuais de substâncias, tais impurezas, aditivos ou componentes individuais deverão ser tidos em conta se os limites de concentração forem iguais ou excederem os limites a seguir especificados:

- 0,1%, para as substâncias classificadas como muito tóxicas, tóxicas, carcinogénicas (categoria 1 ou 2), mutagénicas (categoria 1 ou 2) ou tóxicas para a reprodução (categoria 1 ou 2);
- 1%, para as substâncias classificadas de nocivas, corrosivas, irritantes, sensibilizantes, carcinogénicas (categoria 3), mutagénicas (categoria 3) ou tóxicas para a reprodução (categoria 3);

salvo se o anexo I do presente Regulamento especificar valores inferiores.

Com excepção das substâncias especificamente enumeradas no anexo I, a classificação, no que se refere às propriedades físico-químicas e aos perigos para a saúde, deve ser efectuada em conformidade com o disposto no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho; quanto à rotulagem, deve ser efectuada em conformidade com o disposto na mesma legislação.

A classificação em relação às propriedades físico-químicas é efectuada de acordo com os critérios do capítulo 2 e em relação aos efeitos perigosos para o ambiente e efectuada em conformidade com os critérios do capítulo 5 do presente anexo.

No caso do amianto (650-013-00-6), esta regra geral não se aplica até que um limite de concentração seja fixado no anexo I. As substâncias que contêm amianto devem ser classificadas e rotuladas em conformidade com os princípios definidos nos artigos 17.º a 20.º do presente Regulamento.

1.7.3 Aplicação dos critérios do guia às preparações:

Os critérios orientadores definidos no presente anexo são directamente aplicáveis sempre que os dados em questão tenham sido obtidos por métodos de ensaio comparáveis aos descritos no anexo V, com excepção dos critérios definidos no capítulo 4, aos quais apenas é aplicável o

método convencional. Nos outros casos, os dados disponíveis devem ser avaliados, comparando os métodos de ensaio utilizados com os indicados no anexo V e com as regras especificadas no presente anexo, para determinação da classificação e rotulagem adequadas.

Se os riscos para a saúde forem avaliados por aplicação do método convencional referido no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, os limites de concentração individuais aplicáveis são os especificados:

- no anexo I do presente Regulamento;

- ou no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, no caso de a substância ou substâncias não figurarem no anexo I do presente Regulamento, ou nele figurem sem limites de concentração.

No caso das preparações que contêm misturas de gases, a classificação relativa aos efeitos na saúde será estabelecida pelo método de cálculo, com base nos limites de concentração individuais que figuram no anexo I, ou, se esses limites não figurarem no anexo I, com base nos critérios do Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho.

1.7.3.1 Preparações ou substâncias descritas no ponto 1.7.2.1 utilizadas como componentes de outras preparações:

A rotulagem destas preparações deve obedecer às disposições do artigo 7.º e cumprir as condições previstas no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho. Contudo, em alguns casos, as informações dadas no rótulo da preparação ou substância descrita no parágrafo 1.7.2.1 são insuficientes para permitir que outros produtores, que pretendam utilizá-las como constituintes da sua ou suas preparações, efectuem a classificação e rotulagem correctas dessa ou dessas preparações.

Nesses casos, a pessoa estabelecida na Comunidade e responsável pela colocação da preparação ou substância original, descrita no parágrafo 1.7.2.1, no mercado, quer seja o produtor, o importador ou o distribuidor, deverá fornecer, o mais rapidamente possível, mediante pedido justificado, todos os dados necessários relativos às substâncias perigosas presentes, de modo a permitir a correcta classificação e rotulagem da nova preparação. Esses dados também são necessários para que a pessoa responsável pela colocação da nova preparação no mercado possa cumprir os outros requisitos da presente legislação.

2 Classificação com base nas propriedades físico-químicas

2.1 Introdução:

Os métodos de ensaio relativos às propriedades explosivas, comburentes e de inflamabilidade incluídos no anexo V do presente Regulamento têm por fim dar um significado específico às definições gerais apresentadas nas alíneas a) a e) do artigo 3.º do presente Regulamento. Os critérios advêm directamente dos métodos de ensaio do anexo V, quando mencionados.

Se se dispuser de informações adequadas que indiquem que, na prática, as propriedades físico-químicas das substâncias e preparações (exceptuam-se os peróxidos orgânicos) são diferentes das reveladas pelos métodos de ensaio do anexo V, essas substâncias e preparações deverão ser classificadas de acordo com os eventuais perigos que representem para as pessoas que as manipulem ou para outras pessoas.

2.2 Critérios para a classificação, escolha de símbolos e indicações de perigo e escolha de frases indicadoras de riscos:

No caso das preparações, haverá que ter em conta os critérios referidos no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho.

2.2.1 Explosivo:

As substâncias e preparações serão classificadas como explosivas e caracterizadas pelo símbolo «E» e pela indicação de perigo «explosivo» em função dos resultados dos ensaios referidos no anexo V e desde que sejam explosivas na forma em que são colocadas no mercado. É obrigatória uma frase indicadora de risco, atribuída de acordo com os critérios a seguir definidos:

R2 Risco de explosão por choque, fricção, fogo ou outras fontes de ignição:

- substâncias e preparações, salvo as exceções a seguir indicadas.

R3 Grande risco de explosão por choque, fricção, fogo ou outras fontes de ignição:

- as substâncias e preparações particularmente sensíveis, tais como os sais do ácido pícrico ou o PETN.

2.2.2 Comburente:

As substâncias e preparações serão classificadas como comburentes e caracterizadas pelo símbolo «O» e pela indicação de perigo «comburente» em função dos resultados dos ensaios referidos no anexo V. É obrigatória uma frase indicadora de risco, atribuída com base nos resultados dos ensaios em função dos seguintes critérios:

R7 Pode provocar incêndio:

- peróxidos orgânicos que apresentam propriedades inflamáveis mesmo quando não estão em contacto com outros materiais combustíveis.

R8 Favorece a inflamação de matérias combustíveis:

- outras substâncias e preparações oxidantes, incluindo os peróxidos inorgânicos, que possam provocar incêndios ou aumentar o risco de incêndio quando em contacto com matérias combustíveis.

R9 Pode explodir quando misturado com matérias combustíveis:

- outras substâncias e preparações, incluindo os peróxidos inorgânicos, que se tornem explosivas quando misturadas com matérias combustíveis, por exemplo, certos cloratos.

2.2.2.1 Observações relativas aos peróxidos:

No que respeita às propriedades explosivas, os peróxidos orgânicos e suas preparações, na forma em que são colocados no mercado, são classificados de acordo com os critérios estabelecidos no ponto 2.2.1, com base em ensaios efectuados em conformidade com os métodos que se apresentam no anexo V.

No que se refere às propriedades oxidantes, os métodos do anexo V não são aplicáveis aos peróxidos orgânicos.

Quanto às substâncias, os peróxidos orgânicos ainda não classificados como explosivos são classificados como perigosos com base na respectiva estrutura (por exemplo, R-O-O-H; R(índice 1)-O-O-R(índice 2)).

As preparações ainda não classificadas de explosivas devem ser classificadas através do método de cálculo baseado na percentagem de oxigénio activo descrito no ponto 9.5.

Os peróxidos orgânicos e suas preparações ainda não classificados de explosivos são classificados de explosivos se contiverem:

- mais de 5% de peróxidos orgânicos; ou

- mais de 0,5% de oxigénio disponível dos peróxidos orgânicos e mais de 5% de peróxidos de hidrogénio.

2.2.3 Extremamente inflamável:

As substâncias e preparações serão classificadas como extremamente inflamáveis e caracterizadas pelo símbolo «F+» e pela indicação de perigo «extremamente inflamável» em função dos resultados dos ensaios referidos no anexo V. As frases indicadoras de risco serão atribuídas de acordo com os critérios a seguir definidos:

R12 Extremamente inflamável:

- as substâncias e preparações líquidas cujo ponto de inflamação seja inferior a 0°C e cuja temperatura de ebulição (ou, no caso de um intervalo de ebulição, a temperatura de início da ebulição) não exceda 35°C;
- as substâncias e preparações gasosas inflamáveis em contacto com o ar à temperatura e pressão normais.

2.2.4 Facilmente inflamável:

As substâncias e preparações serão classificadas como facilmente inflamáveis e caracterizadas pelo símbolo «F» e pela indicação de perigo «facilmente inflamável» em função dos resultados dos ensaios referidos no anexo V. As frases indicadoras de risco serão atribuídas de acordo com os critérios a seguir definidos:

R11 Facilmente inflamável

- as substâncias e preparações sólidas que possam inflamar-se facilmente por breve contacto com uma fonte de ignição e que continuam a arder ou a ser consumidas depois do afastamento dessa fonte;
- as substâncias e preparações líquidas cujo ponto de inflamação seja inferior a 21°C mas que não sejam extremamente inflamáveis.

R15 Em contacto com a água liberta gases extremamente inflamáveis:

- as substâncias e preparações que, em contacto com a água ou com ar húmido, libertem gases extremamente inflamáveis em quantidades perigosas (no mínimo, 1 l/kg/h).

R17 Espontaneamente inflamável ao ar:

- as substâncias e preparações que possam aquecer e, finalmente, inflamar-se em contacto com o ar à temperatura ambiente, sem qualquer fornecimento de energia.

2.2.5 Inflamável:

As substâncias e preparações serão classificadas como inflamáveis em função dos resultados dos ensaios referidos no anexo V. A frase indicadora de risco será atribuída de acordo com os critérios a seguir definidos:

R10 Inflamável:

- as substâncias e preparações líquidas cujo ponto de inflamação seja igual ou superior a 21°C e inferior ou igual a 55°C.

No entanto, foi demonstrado na prática que não é necessário classificar de inflamável uma preparação com ponto de inflamação igual ou superior a 21°C e inferior ou igual a 55°C, se essa preparação não puder, de nenhuma forma, manter a combustão e, nesse caso, apenas se não envolver qualquer risco para as pessoas que a manipulem ou para outras pessoas.

2.2.6 Outras propriedades físico-químicas:

Às substâncias e preparações classificadas em conformidade com os parágrafos 2.2.1 a 2.2.5 precedentes ou com os capítulos 3, 4 e 5 subsequentes serão atribuídas outras frases indicadoras de risco, de acordo com os critérios a seguir definidos (baseados na experiência adquirida durante a elaboração do anexo I):

R1 Explosivo no estado seco:

- as substâncias e preparações explosivas colocadas no mercado em solução ou numa forma húmida, tais como a nitrocelulose com mais de 12,6% de azoto.

R4 Forma compostos metálicos explosivos muito sensíveis:

- as substâncias e preparações que possam formar derivados metálicos explosivos sensíveis, tais como o ácido pícrico e o ácido estífnico.

R5 Perigo de explosão sob a acção do calor:

- as substâncias e preparações termicamente instáveis não classificadas como explosivas, tais como o ácido perclórico de concentração superior a 50%.

R6 Perigo de explosão com ou sem contacto com o ar:

- as substâncias e preparações instáveis à temperatura ambiente, tais como o acetileno.

R7 Pode provocar incêndio:

- as substâncias e preparações reactivas, tais como o flúor e o hidrossulfito de sódio.

R14 Reage violentamente em contacto com a água:

- as substâncias e preparações que reajam violentamente com a água, tais como o cloreto de acetilo, os metais alcalinos e o tetracloreto de titânio.

R16 Explosivo quando misturado com substâncias comburentes:

- as substâncias e preparações que reajam de forma explosiva com agentes oxidantes, tais como o fósforo vermelho.

R18 Pode formar mistura vapor-ar explosiva/inflamável durante a utilização:

- as preparações que, não sendo classificadas como inflamáveis, contenham componentes voláteis inflamáveis em contacto com o ar.

R19 Pode formar peróxidos explosivos:

- as substâncias e preparações que possam formar peróxidos explosivos durante o armazenamento, tais como o éter etílico e o 1,4 -dioxano.

R30 Pode-se tornar facilmente inflamável durante o uso:

- as preparações que, não sendo classificadas como inflamáveis, possam tornar-se inflamáveis por perda de componentes voláteis não inflamáveis.

R44 Risco de explosão se aquecido em ambiente fechado:

- substâncias e preparações que, não sendo classificadas como explosivas em conformidade com o ponto 2.2.1, possam, na prática, apresentar propriedades explosivas quando aquecidas num ambiente demasiado fechado. É o caso, por exemplo, de determinadas substâncias que, quando aquecidas num recipiente de aço, se decompõem de forma explosiva mas que não apresentam essa característica quando aquecidas em recipientes menos resistentes.

Para outras frases indicadoras de risco v. o parágrafo 3.2.7.

3 Classificação com base em propriedades toxicológicas

3.1 Introdução:

3.1.1 A classificação está associada aos efeitos agudo e a longo prazo das substâncias e preparações, quer resultem de uma única exposição quer de uma exposição repetida ou prolongada.

Se tiver sido convenientemente demonstrado que, na prática, o efeito tóxico das substâncias e das preparações nos seres humanos é, ou pode ser, diferente do efeito previsto a partir dos resultados experimentais obtidos em animais ou por aplicação do método convencional referido no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, essas substâncias e preparações deverão ser classificadas de acordo com a sua toxicidade nos seres humanos. Contudo, os ensaios em seres humanos devem ser desaconselhados e, normalmente, não deverão ser utilizados para contradizer dados positivos obtidos em animais.

3.1.2 A classificação das substâncias deve ser efectuada com base nos dados experimentais disponíveis e de acordo com os critérios seguintes, que têm em conta a amplitude desses efeitos:

a) Para a toxicidade aguda (efeitos letais e irreversíveis após uma única exposição), serão utilizados os critérios dos parágrafos 3.2.1 a 3.2.3;

b) Para a toxicidade subaguda, subcrónica ou crónica, serão utilizados os critérios dos parágrafos 3.2.2 a 3.2.4;

c) Para os efeitos corrosivos e irritantes, serão utilizados os critérios dos parágrafos 3.2.5 e 3.2.6;

d) Para os efeitos de sensibilização, serão utilizados os critérios do parágrafo 3.2.7;

e) Para os efeitos específicos na saúde (carcinogénicos, mutagénicos e tóxicos para a reprodução), serão utilizados os critérios descritos no capítulo 4.

3.1.3 No caso das preparações, a classificação relativa aos perigos para a saúde efectua-se do modo seguinte:

a) Com base no método convencional referido no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, na ausência de dados experimentais. Neste caso, a classificação baseia-se nos limites de concentração individuais fixados:

- quer no anexo I do presente Regulamento:

- quer no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, sempre que a substância ou substâncias não figurarem no anexo I do presente Regulamento ou nele figurem mas sem limites de concentração;

b) Ou, no caso de existirem dados experimentais, de acordo com os critérios descritos no parágrafo 3.1.2, excluindo as propriedades carcinogénicas, mutagénicas e de toxicidade para a reprodução referidas na alínea e) do parágrafo 3.1.2, cuja avaliação deve ser efectuada pelo método convencional estabelecido no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho.

Qualquer que seja o método utilizado para a avaliação dos riscos de uma preparação, deve-se atender a todos os efeitos perigosos para a saúde que são definidos no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho.

3.1.4 Sempre que a classificação seja estabelecida com base em resultados experimentais obtidos em ensaios com animais, esses resultados deverão ter validade para os seres humanos, reflectindo os riscos de modo adequado.

3.1.5 A toxicidade aguda por via oral das substâncias ou preparações colocadas no mercado pode ser estabelecida quer por um método que permita a determinação do valor DL (índice 50) quer através da determinação da dose discriminante (pelo método da dose fixa).

A dose discriminante é a dose que provoca toxicidade evidente sem causar mortalidade e deverá ser um dos quatro níveis de dosagem especificados no anexo V (5, 50, 500 ou 2000 mg/kg de massa corporal).

O conceito de «toxicidade evidente» corresponde a efeitos tóxicos, decorrentes da exposição à substância testada, tão intensos que a exposição à dose fixa superior causará, provavelmente, mortalidade.

Os resultados do teste de uma determinada dose poderão ser:

- menos de 100% de sobreviventes;
- 100% de sobreviventes, embora com toxicidade evidente;
- 100% de sobreviventes sem toxicidade evidente.

O método utilizado exige, em alguns casos, que sejam testadas doses inferiores ou superiores, caso o nível apropriado não tenha ainda sido testado. Também deve ser referido o quadro de avaliação do método de ensaio B.1 bis anexo V.

Nos critérios dos parágrafos 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3 apenas se apresenta o resultado final dos testes. A dose de 2000 mg/kg deve ser testada em primeiro lugar quando se pretenda obter informações sobre os efeitos tóxicos das substâncias de baixa toxicidade aguda e que não sejam classificadas com base em toxicidade aguda.

3.2 Critérios para a classificação, escolha de símbolos e indicações de perigo e escolha de frases indicadoras de riscos:

3.2.1 Muito tóxico:

As substâncias e preparações serão classificadas como muito tóxicas e caracterizadas pelo símbolo «T+» e pela indicação de perigo «muito tóxico» de acordo com os critérios a seguir especificados.

As frases indicadoras de risco serão atribuídas de acordo com os seguintes critérios:

R28 Muito tóxico por ingestão:

Resultados de toxicidade aguda:

- DL(índice 50) por via oral, no rato ≤ 25 mg/kg;
- menos de 100% de sobreviventes, a 5 mg/kg, por via oral, no rato utilizando o método da dose fixa.

R27 Muito tóxico em contacto com a pele:

Resultados de toxicidade aguda:

- DL(índice 50) por via cutânea, no rato ou no coelho: ≤ 50 mg/kg.

R26 Muito tóxico por inalação:

Resultados de toxicidade aguda:

- CL(índice 50) por inalação, no rato, para aerossóis ou partículas: $\leq 0,25$ mg/litro/4h;
- CL(índice 50) por inalação, no rato, por gases e vapores: $\leq 0,5$ mg/litro/4h.

R39 Perigo de efeitos irreversíveis muito graves:

- no caso de existirem elementos concludentes quanto à possibilidade de danos irreversíveis, diferentes dos efeitos referidos no capítulo 4, através de uma única exposição por uma via adequada, geralmente na gama de doses acima referida.

Para indicar a via de administração/exposição, deve ser utilizada uma das seguintes combinações: R39/26, R39/27, R39/28, R39/26/27, R39/26/28, R39/27/28, R39/26/27/28.

3.2.2 Tóxico:

As substâncias e preparações devem ser classificadas como tóxicas, e caracterizadas pelo símbolo «T» e a indicação de perigo «tóxico», de acordo com os critérios a seguir especificados. As frases indicadoras de risco serão atribuídas de acordo com os critérios a seguir definidos:

R25 Tóxico por ingestão:

Resultados de toxicidade aguda:

- DL(índice 50) por via oral, no rato: $25 < \text{DL(índice 50)} \leq 200$ mg/kg;
- dose discriminante, 5 mg/kg, por via oral, no rato: 100% de sobreviventes, mas apresentando toxicidade evidente.

R24 Tóxico em contacto com a pele:

Resultados de toxicidade aguda:

- DL(índice 50) por via cutânea, no rato ou no coelho: $50 < \text{DL(índice 50)} = 400$ mg/kg.

R23 Tóxico por inalação:

Resultados de toxicidade aguda:

- CL(índice 50) por inalação, no rato, para aerossóis e partículas: 0,25

CL(índice 50) ≤ 1 mg/litro/4 h;

- CL(índice 50) por inalação, no rato, para gases e vapores: $0,5 < \text{CL(índice 50)} \leq 2$ mg/litro/4 h.

R39 Perigo de efeitos irreversíveis muito graves:

- no caso de existirem elementos concludentes quanto à possibilidade de danos irreversíveis, diferentes dos efeitos referidos no capítulo 4, através de uma única exposição por uma via adequada, geralmente na gama de doses acima referida.

Para indicar a via de administração/exposição, deve ser utilizada uma das seguintes combinações: R39/23, R39/24, R39/25, R39/23/24, R39/23/25, R39/24/25, R39/23/24/25.

R48 Risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada:

- no caso de efeitos graves (perturbações funcionais ou alterações morfológicas evidentes de origem toxicológica) que possam ser causados por exposição repetida ou prolongada por uma via adequada.

As substâncias e as preparações serão classificadas pelo menos como «tóxicas» sempre que estes efeitos sejam observados a níveis inferiores, numa ordem de grandeza (isto é, 10 vezes), aos níveis estabelecidos para a R48 no parágrafo 3.2.3. Para indicar a via de

administração/exposição, deve ser utilizada uma das seguintes combinações: R48/23, R48/24, R48/25, R48/23/24, R48/23/25, R48/24/25, R48/23/24/25.

3.2.3 Substâncias nocivas:

As substâncias e preparações devem ser classificadas de nocivas, sendo-lhes atribuído o símbolo «Xn» e a indicação de perigo «nocivo», em conformidade com os critérios a seguir especificados. As frases indicadoras de risco serão atribuídas de acordo com os seguintes critérios:

R22 Nocivo por ingestão:

Resultados de toxicidade aguda:

- DL(índice 50) por via oral, no rato: $200 < \text{DL(índice 50)} \leq 2000 \text{ mg/kg}$;
- dose discriminante, por via oral, no rato, 50 mg/kg: 100% de sobrevivência, mas efeitos tóxicos evidentes;
- sobrevivência inferior a 100% a 50 mg/kg, no rato, por via oral, através do procedimento de dosagem fixa. Ver o quadro de avaliação do método de ensaio B.1, a), do anexo V.

R21 Nocivo em contacto com a pele:

Resultados de toxicidade aguda:

- DL(índice 50) por contacto com a pele, no rato ou no coelho: 400

DL(índice 50) $\leq 2000 \text{ mg/kg}$.

R20 Nocivo por inalação:

Resultados de toxicidade aguda:

- CL(índice 50) por inalação, no rato, para aerossóis e partículas: 1

CL(índice 50) $\leq 5 \text{ mg/litro/4 h}$;

- CL(índice 50) por inalação, no rato, para gases e vapores: $2 < \text{CL(índice 50)} \leq 20 \text{ mg/litro/4 h}$.

R65 Nocivo: pode causar danos nos pulmões se ingerido:

Substâncias e preparações líquidas que apresentem para o homem um risco de aspiração em virtude da sua baixa viscosidade, ou seja:

a) Substâncias e preparações que contenham hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos e aromáticos numa concentração total equivalente ou superior a 10% e se caracterizem igualmente por:

- um tempo de escoamento inferior a 30 segundos num cone ISO de 3 mm em conformidade com a norma ISO 2431; ou
- uma viscosidade cinemática inferior a $7 \times 10^6 \text{ (elevado a } -6) \text{ m}^2/\text{s}$ a 40°C, medida por um viscosímetro capilar calibrado em vidro em conformidade com a norma ISO 3104/3105; ou
- uma viscosidade cinemática inferior a $7 \times 10^6 \text{ (elevado a } -6) \text{ m}^2/\text{s}$ a 40°C, deduzida de medições da viscosidade rotacional em conformidade com a norma ISO 3129;

Nota. - Não é necessário classificar as substâncias e preparações que satisfazem estes critérios se a sua tensão superficial média, determinada por um tensiómetro de du Nuoy ou através dos métodos de ensaio referidos na parte A.5 do anexo V, for superior a 33 mN/m a 25°C;

b) Outras substâncias e preparações classificadas com base na experiência prática em seres humanos.

R40 Possibilidade de efeitos irreversíveis:

- indicações evidentes da possibilidade de ocorrerem danos irreversíveis além dos referidos no capítulo 4 mediante exposição pontual por uma via adequada, geralmente na gama de doses acima referida.

Para indicar a via de administração/exposição, deve-se utilizar uma das seguintes combinações: R40/20, R40/21, R40/22, R40/20/21, R40/20/22, R40/21/22, R40/20/21/22.

R48 Risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada:

- Possibilidade de ocorrência de danos graves (distúrbio funcional ou alterações morfológicas com importância toxicológica) mediante a exposição repetida ou prolongada por uma via adequada.

As substâncias e preparações devem classificar-se, pelo menos, de nocivas sempre que se observem os referidos efeitos para níveis da ordem de:

- via oral, no rato ≤ 50 mg/kg (massa corporal)/dia;
- via dérmica, no rato ou no coelho ≤ 100 mg/kg (massa corporal)/dia;
- inalação, no rato $\leq 0,25$ mg/l, 6 h/dia.

Os valores-guia são directamente aplicáveis nos casos em que se observem lesões graves num ensaio de toxicidade subcrónica (90 dias). Ao interpretar os resultados de um ensaio de toxicidade subaguda (28 dias), devem multiplicar-se os valores por um factor aproximado de 3. Os ensaios de toxicidade crónica (2 anos) disponíveis devem ser avaliados caso a caso. Se se encontrarem disponíveis resultados de estudos com diversas durações, devem utilizar-se, em geral, os resultados do estudo de maior duração.

Para indicar a via de administração/exposição, deve utilizar-se uma das seguintes combinações: R48/20, R48/21, R48/22, R48/20/21, R48/20/22, R48/21/22, R48/20/21/22.

3.2.3.1 Observações respeitantes a substâncias voláteis:

No que respeita a determinadas substâncias com elevada pressão de vapor, poderão existir dados referentes a efeitos que constituam motivo de preocupação. Essas substâncias poderão não ser classificadas com base nos critérios relativos aos efeitos na saúde do presente guia (3.2.3) ou não serem abrangidas pelo ponto 3.2.8. Contudo, quando essas substâncias apresentem, comprovadamente, riscos na manipulação e na utilização normais, poderá ser necessário classificá-las, caso a caso, no anexo I.

3.2.4 Comentários relativos à utilização da R48:

A utilização desta frase indicadora de risco refere a gama específica de efeitos biológicos, nos termos a seguir definidos. Na aplicação desta frase indicadora de risco, os efeitos graves para a saúde incluirão a morte e perturbações funcionais ou modificações morfológicas evidentes de origem toxicológica, o que é particularmente importante nos casos em que as modificações são irreversíveis. Também é importante ter em conta não só as modificações graves específicas num único órgão ou sistema biológico mas também as modificações generalizadas de natureza menos grave, envolvendo diversos órgãos, ou as modificações graves do estado geral de saúde.

Ao fazer-se a avaliação da existência de provas deste tipo de efeito, ter-se-ão em conta as seguintes directrizes:

1) Elementos que indicam que a frase R48 deve ser aplicada:

a) Mortes devidas à substância;

b):

i) Importantes modificações funcionais nos sistemas nervosos central ou periférico, incluindo a visão, a audição e o olfacto, determinadas por observações clínicas ou por outros métodos adequados (por exemplo, por electrofisiologia);

ii) Importantes modificações funcionais noutros sistemas orgânicos (por exemplo, nos pulmões);

c) Quaisquer modificações significativas dos parâmetros bioquímicos clínicos, hematológicos ou de urinalise que indiquem graves disfunções orgânicas. As perturbações hematológicas serão particularmente importantes se os dados indicarem que são provocadas por diminuição da produção de células sanguíneas pela medula óssea;

d) Lesões orgânicas graves observadas por exame microscópico na autópsia:

i) Necrose, fibrose ou formação de granuloma graves ou generalizadas em órgãos vitais com capacidade regenerativa (por exemplo, o fígado);

- ii) Modificações morfológicas graves que sejam potencialmente reversíveis mas em que haja provas concludentes de disfunção orgânica acentuada (por exemplo, degeneração gorda hepática grave, necrose tubular aguda do rim, gastrite ulcerosa);
- iii) Provas de morte celular significativa em órgãos vitais incapazes de regeneração (por exemplo, fibrose miocárdica ou necrose neuronal) ou nas populações de células progenitoras (por exemplo, aplasia ou hipoplasia medular).

As provas anteriores serão obtidas, na maior parte dos casos, em ensaios com animais. Ao avaliar os dados obtidos a partir da experiência prática, deve-se prestar especial atenção aos níveis de exposição:

2) Provas que indicam que a R48 não deve ser aplicada:

A utilização desta frase indicadora de risco restringe-se aos «efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada». É possível observar diversos efeitos associados a substâncias, tanto em seres humanos como em animais, que não justificam a utilização da frase R48. Esses efeitos são importantes sempre que se tente determinar a dose sem efeito de uma substância química. Entre os exemplos de modificações bem documentadas que normalmente não justificam a classificação com a R48, independentemente do seu significado estatístico, contam-se:

- a) Observações clínicas ou modificações no aumento da massa corporal, do consumo de alimentos ou da ingestão de água, que podem possuir alguma importância toxicológica mas que, por si sós, não são indicadores de «efeitos graves»;
- b) Pequenas modificações dos parâmetros bioquímicos clínicos, hematológicos ou de urinálise, de importância toxicológica mínima ou duvidosa;
- c) Modificações na massa de órgãos sem que haja sintomas de disfunção orgânica;
- d) Respostas adaptativas (por exemplo, migração de macrófagos para o pulmão, hipertrofia e indução enzimática hepáticas, respostas hiperplásicas aos agentes irritantes). Efeitos locais na pele produzidos por aplicação cutânea repetida de uma substância que é mais adequadamente classificada com a frase R38 «irritante para a pele»;
- e) Sempre que tenha sido demonstrada a existência de um mecanismo de toxicidade específico da espécie (por exemplo, percursos metabólicos específicos).

3.2.5 Corrosivo:

Considera-se que uma substância ou preparação é corrosiva se, ao ser aplicada na pele intacta e saudável de um animal, ocorrer a destruição dos tecidos da pele em toda a sua espessura em pelo menos um animal, durante o ensaio sobre irritação da pele referido no anexo V ou durante a aplicação de um método equivalente, ou no caso desses resultados serem previsíveis, por exemplo, tratando-se de reacções fortemente ácidas ou alcalinas (pH comprovadamente inferior ou igual a 2 ou superior ou igual a 11,5); deve-se também atender à capacidade alcalina ou ácida.

A classificação poderá basear-se em resultados de ensaios in vitro validados.

As substâncias e preparações serão classificadas como corrosivas e caracterizadas pelo símbolo «C» e pela indicação de perigo «corrosivo». As frases indicadoras de risco serão atribuídas de acordo com os critérios a seguir definidos:

R35 Provoca queimaduras graves:

- se, quando aplicada na pele intacta e sã de um animal, ocorrer a destruição dos tecidos da pele em toda a sua espessura após um período de exposição não superior a 3 minutos, ou se tal resultado for previsível.

R34 Provoca queimaduras:

- se, quando aplicada na pele intacta e sã de um animal, ocorrer a destruição dos tecidos da pele em toda a sua espessura após um período de exposição não superior a 4 horas, ou se tal resultado for previsível;
- hidroperóxidos orgânicos, excepto quando existam provas em contrário.

3.2.6 Irritante:

As substâncias e preparações serão classificadas de irritantes e caracterizadas pelo símbolo «Xi» e pela indicação de perigo «irritante» de acordo com os critérios a seguir indicados:

3.2.6.1 Inflamação da pele:

A frase indicadora de risco que se segue será atribuída de acordo com os critérios subsequentes:

R38 Irritante para a pele:

- substâncias e preparações que provoquem inflamação significativa da pele, persistente durante pelo menos 24 horas após um período de exposição não superior a quatro horas, no coelho, de acordo com o método de ensaio de irritação cutânea referido no anexo V.

A inflamação da pele será significativa se:

- a) O valor médio, quer no caso da formação de escaras e eritema quer no caso da formação de edema, calculado para o conjunto dos animais submetidos aos testes, for 2 ou mais; ou
- b) Tiver sido observado um valor médio, calculado para cada animal separadamente, em dois ou mais animais, quer no caso da formação de escaras e eritema quer no caso da formação de edema, equivalente a 2 ou mais, no caso de o ensaio do anexo V ter sido conduzido com três animais.

Em ambos os casos, para o cálculo dos respectivos valores médios, deverão ser utilizados todos os valores relativos a cada um dos efeitos, que tenham sido observados em cada momento de leitura (24, 48 e 72 horas).

A inflamação da pele também será significativa se persistir em pelo menos dois animais no final do período de observação. Devem ser tomados em conta efeitos particulares, por exemplo, hiperplasia, descamação, alterações da cor, fissuras, cicatrizes e alopecia.

Podem também obter-se dados importantes com base em ensaios não agudos com animais [v. comentários à frase R48 na alínea 2, d)]. Os referidos dados são considerados significativos se os efeitos observados forem idênticos aos descritos supra.

- substâncias e preparações que provoquem inflamação significativa da pele, com base em observações efectuadas em seres humanos, por contacto imediato, prolongado ou repetido;
- peróxidos orgânicos, excepto quando existam dados que indiquem o contrário.

Parestesia:

A parestesia causada no homem pelo contacto cutâneo com pesticidas piretróides não é considerada um efeito irritante que justifique a classificação como Xi; R38. Deve, todavia, aplicar-se a frase S24 a substâncias que causem o referido efeito.

3.2.6.2 Lesões oculares:

As frases indicadoras de risco que se seguem serão atribuídas de acordo com seguintes critérios a seguir enumerados:

R36 Irritante para os olhos:

- substâncias e preparações que, quando aplicadas nos olhos dos animais, provoquem lesões oculares significativas, que ocorram no período de 72 horas que se segue à exposição e que persistam durante, pelo menos, 24 horas.

As lesões oculares serão significativas se algum dos valores médios do ensaio de irritação ocular referido no anexo V for:

- superior ou igual a 2 mas inferior a 3, para a opacidade da córnea;
- superior ou igual a 1 mas não superior a 1,5, para a lesão da íris;
- superior ou igual a 2,5, para a vermelhidão da conjuntiva;
- superior ou igual a 2, para o edema da conjuntiva (quimose);

ou, no caso de o ensaio do anexo V ter sido conduzido em três animais, se as lesões, em dois ou mais animais, forem equivalentes a um dos valores precedentes, com a ressalva de que, no que se refere à lesão da íris, o valor deverá ser superior ou igual a 1 mas inferior a 2 e, no que se refere à vermelhidão da conjuntiva, o valor deverá ser superior ou igual a 2,5.

Em ambos os casos, para o cálculo dos respectivos valores médios, deverão ser utilizados todos os valores relativos a cada um dos efeitos que tenham sido observados em cada momento de leitura (24, 48 e 72 horas):

- substâncias e preparações que provoquem lesões oculares significativas, com base na experiência prática em seres humanos;
- peróxidos orgânicos, excepto quando existam provas em contrário.

R41 Risco de graves lesões oculares:

- substâncias e preparações que, quando aplicadas nos olhos dos animais, provoquem lesões oculares graves, que ocorram no período de 72 horas depois da instilação e que persistam durante, pelo menos, 24 horas.

As lesões oculares serão graves se algum dos valores médios do ensaio de irritação ocular referido no anexo V for:

- superior ou igual a 3, para a opacidade da córnea;
- superior ou igual a 1,5, para a lesão da íris.

O mesmo se deverá passar se o ensaio efectuado tiver sido efectuado em três animais, se algum dos valores dessas lesões, em dois ou mais animais, for:

- superior ou igual a 3, para a opacidade da córnea;
- superior ou igual a 2, para a lesão da íris.

As lesões oculares também serão graves quando persistirem no final do período de observação.

As lesões oculares também serão graves se a substância ou preparação causar coloração irreversível dos olhos.

- substâncias e preparações que provoquem lesões oculares graves, com base na experiência prática em seres humanos.

Nota. - Quando uma substância ou preparação é classificada como corrosiva, sendo-lhe atribuída a R34 ou a R35, o risco de lesões oculares graves considera-se implícito e a R41 não figurará no rótulo. Contudo, no caso das preparações ao calcular-se a soma dos quocientes pelas fórmulas do Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, as substâncias classificadas como corrosivas devem ser consideradas como se lhes tivesse sido atribuída a R41.

3.2.6.3 Irritação do sistema respiratório:

A frase indicadora de risco que se segue será atribuída de acordo com os critérios enumerados:

R37 Irritante para as vias respiratórias:

Substâncias e preparações que provoquem irritação grave do sistema respiratório com base em:

- observações práticas nos seres humanos;
- resultados positivos obtidos nos ensaios adequados com animais.

Comentários relativos à utilização da frase R37

Na interpretação das observações práticas nos seres humanos, é importante estabelecer a distinção entre os efeitos que conduzem a uma classificação com a frase R48 (v. ponto 3.2.4) e os que conduzem a uma classificação com a frase R37. As condições que conduzem normalmente à classificação com a frase R37 são reversíveis e normalmente limitadas às vias respiratórias superiores.

Resultados positivos nos ensaios adequados com animais podem incluir dados obtidos num ensaio geral de toxicidade, nomeadamente dados histopatológicos relativos ao sistema respiratório. Podem igualmente ser utilizados dados resultantes da medição da bradipneia experimental para avaliar a irritação das vias respiratórias.

3.2.7 Sensibilização:

3.2.7.1 Sensibilização por inalação:

As substâncias e preparações serão classificadas de sensibilizantes e caracterizadas pelo símbolo «Xn», pela indicação de perigo «nocivo» e pela frase indicadora de risco R42 de acordo com os critérios a seguir definidos:

R42 Pode causar sensibilização por inalação:

- no caso de existirem provas de que essas substâncias ou preparações podem induzir uma hipersensibilidade respiratória específica;
- no caso de se obterem resultados positivos nos ensaios adequados com animais;
- se a substância for um isocianato, salvo se, comprovadamente, a substância não provocar hipersensibilidade respiratória.

Comentários relativos à utilização da frase R42

Provas dos efeitos nos seres humanos:

As provas de que a substância pode provocar uma hipersensibilidade respiratória específica serão em princípio baseadas na experiência prática com os seres humanos. Neste contexto, considera-se normalmente a asma como uma manifestação de hipersensibilidade, mas podem igualmente ser consideradas outras reacções de hipersensibilidade como a rinite e a alveolite. A condição observada terá o carácter clínico de uma reacção alérgica. Todavia, não é necessário demonstrar os mecanismos imunológicos.

Quando se procede à análise dos elementos resultantes da exposição dos seres humanos, para proceder à classificação, é necessário tomar ainda em consideração, para além das provas obtidas a partir dos casos estudados, o seguinte:

- a dimensão da população exposta;
- o grau de exposição.

As supramencionadas provas poderão ser as seguintes:

- antecedentes clínicos e dados obtidos em ensaios das funções respiratórias relacionados com a exposição à substância, confirmados por outras provas, por exemplo;
- uma estrutura química associada a substâncias conhecidas como provocando uma hipersensibilidade respiratória;
- um ensaio imunológico in vivo (por exemplo, testes de escarificação);
- um ensaio imunológico in vitro (por exemplo, análise serológica);
- estudos susceptíveis de indicar outros mecanismos de acção específicos mas não imunológicos, por exemplo, uma irritação ligeira repetida, efeitos induzidos por uma acção farmacológica;
- dados obtidos em ensaios positivos nos brônquios com a substância, efectuados de acordo com directrizes reconhecidas para a determinação de uma reacção específica de hipersensibilidade.

Os antecedentes clínicos devem incluir tanto os antecedentes médicos como profissionais, a fim de estabelecer uma relação entre a exposição a uma substância específica e o desenvolvimento de uma hipersensibilidade respiratória. As informações relevantes incluem nomeadamente factores de agravamento quer no domicílio, quer no local de trabalho, o aparecimento e a evolução da doença, os antecedentes familiares e médicos do paciente em questão. Os antecedentes médicos deverão igualmente incluir uma menção a outras perturbações alérgicas ou respiratórias que se tenham manifestado desde a infância e igualmente os antecedentes de tabagismo.

Os resultados de ensaios positivos nos brônquios são considerados como fornecendo por si só provas suficientes para a classificação. Todavia, reconhece-se que na prática já deverão ter sido efectuados muitos dos exames acima enumerados.

As substâncias que apenas provocam sintomas de asma por irritação em indivíduos que sofrem de hiper-reatividade dos brônquios não devem ser classificadas com a frase de risco R42.

Estudos com animais:

Os dados obtidos nos ensaios susceptíveis de indicar o potencial de uma substância para provocar sensibilização por inalação nos seres humanos podem incluir:

- determinação da IgE (por exemplo, em ratos);
- reacções pulmonares específicas nas cobaias.

3.2.7.2 Sensibilização por contacto com a pele:

As substâncias e preparações serão classificadas como sensibilizantes e caracterizadas pelo símbolo «Xi», pela indicação de perigo «irritante» e pela frase de risco R43 de acordo com os critérios a seguir definidos:

R43 Pode causar sensibilização em contacto com a pele:

- se a experiência prática demonstrar que as substâncias ou preparações podem induzir uma reacção de sensibilização por contacto com a pele, num número substancial de pessoas; ou
- no caso de se verificarem resultados positivos nos ensaios adequados com animais.

Comentários relativos à utilização da frase R43

Provas dos efeitos nos seres humanos:

Os elementos seguintes (experiência prática) são suficientes para classificar a substância com a frase de risco R43:

- dados positivos obtidos por meio dos ensaios epicutâneos pertinentes, normalmente em mais de uma clínica dermatológica; ou
- estudos epidemiológicos que revelem o aparecimento de dermatites alérgicas de contacto causadas pela substância. Devem ser estudadas com uma atenção particular as circunstâncias em que uma elevada percentagem dos que foram expostos apresentam sintomas característicos, mesmo se os casos forem poucos numerosos; ou
- dados positivos obtidos em ensaios experimentais com seres humanos (v. igualmente ponto 3.1.1).

Os elementos seguintes são suficientes para classificar uma substância com a frase de risco R43 sempre que existirem provas de apoio:

- episódios isolados de dermatites alérgicas de contacto; ou
- estudos epidemiológicos em que o acaso, a predisposição ou outros factores de dúvida não foram excluídos com um grau de segurança aceitável.

As provas de apoio poderão incluir:

- dados obtidos em ensaios com animais realizados de acordo com directrizes reconhecidas, com resultados não conformes com os critérios enunciados na secção relativa aos estudos com animais mas suficientemente próximos dos limites para serem considerados como significativos; ou
- dados obtidos por meio de métodos não normalizados; ou
- relações estrutura-actividade adequadas.

Estudos com animais:

Resultados positivos nos ensaios adequados com animais são:

- no caso do método de ensaio, com adjuvantes tipo, para a sensibilização da pele que é descrito no anexo V ou no caso de outros métodos de ensaio com adjuvantes do mesmo tipo, considera-se positiva uma resposta em pelo menos 30% dos animais;
- Com qualquer outro tipo de método de ensaio, considera-se positiva uma resposta em pelo menos 15% dos animais.

3.2.7.3 Urticária de contacto de origem imunológica:

Algumas substâncias ou preparações que satisfazem os critérios correspondentes à frase R42 podem, para além disso, causar urticárias de contacto de origem imunológica. Neste caso, é necessário incluir informações relativas à urticária de contacto por meio da utilização das frases S adequadas, geralmente as frases S24 e S36/37 e integrá-las na Ficha de Dados de Segurança.

Para as substâncias que provocam sinais de urticária de contacto de origem imunológica e que não satisfazem os critérios correspondentes à frase R42, é necessário considerar uma caracterização por meio da frase R43.

Não existe um modelo animal reconhecido para identificar as substâncias que causam urticárias de contacto de origem imunológica. Por conseguinte, a classificação deverá, de um modo geral, ser baseada nas provas dos efeitos nos seres humanos semelhantes às que dizem respeito à sensibilização cutânea (R43).

3.2.8 Outras propriedades toxicológicas:

Às substâncias e preparações classificadas em conformidade com os pontos 2.2.1 a 3.2.7 precedentes e ou os capítulos 4 e 5 serão atribuídas outras frases indicadoras de risco, de acordo com os seguintes critérios, baseados na experiência obtida durante a compilação do anexo I:

R29 Em contacto com a água liberta vapores tóxicos:

Para substâncias e preparações que, em contacto com a água ou a humidade do ar, libertam gases tóxicos ou muito tóxicos (por exemplo, fosforeto de alumínio, pentassulfureto de fósforo) em quantidades potencialmente perigosas.

R31 Em contacto com ácidos liberta gases tóxicos:

Para substâncias e preparações que reagem com ácidos, libertando gases tóxicos (por exemplo, hipoclorito de sódio, polissulfureto de bário) em quantidades potencialmente perigosas. Para substâncias utilizadas pelo público em geral, é mais adequada a frase S50 [não misturar com ... (a especificar pelo fabricante)].

R32 Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos:

Para substâncias e preparações que reagem com ácidos, libertando gases muito tóxicos (por exemplo sais de cianeto de hidrogénio, azida de sódio) em quantidades potencialmente perigosas. Para substâncias utilizadas pelo público em geral, é mais adequada a utilização da frase S50 [não misturar com ... (a especificar pelo fabricante)].

R33 Perigo de efeitos cumulativos:

Para substâncias e preparações cuja acumulação no organismo humano seja provável e possa causar preocupações mas não seja suficiente para o uso da frase R48.

R64 Pode causar danos nas crianças alimentadas com leite materno:

Para substâncias e preparações absorvidas pelas mulheres que possam interferir com a lactação ou possam encontrar-se presentes (nomeadamente na forma de metabolitos) no leite materno em quantidades que suscitem preocupações sobre a saúde dos lactentes.

Para os comentários sobre a frase R64 e o respectivo uso (bem como em alguns casos, a frase R33), v. o ponto 4.2.3.3.

R66 A exposição repetida pode causar secura ou fissuração cutâneas:

Para substâncias e preparações que possam causar problemas em virtude dos seus efeitos de secura, descamação ou fissuração cutâneas, mas que não satisfazem os critérios da frase R38:

Com base em:

- observações práticas na sequência do manuseamento ou utilização normais; ou
- dados importantes relativos aos efeitos cutâneos previsíveis.

V. também os pontos 1.6 e 1.7.

R67 Os vapores podem causar sonolência e tonturas:

Para substâncias e preparações voláteis que contenham componentes que causem sintomas inequívocos de depressão do sistema nervoso central por inalação, ainda não classificadas em matéria de toxicidade aguda por inalação (R20, R23, R26, R40/20, R39/23 ou R39/26).

Podem utilizar-se as seguintes fontes de informação:

a) Dados provenientes de estudos com animais que mostrem sintomas inequívocos de depressão do sistema nervoso central por inalação, tais como letargia, descoordenação (incluindo perda do reflexo de endireitamento) e ataxia:

- quer com concentrações/tempos de exposição não superiores a 20 mg/l/4 h;
- quer no caso da razão entre a concentração que causa os referidos efeitos, num período igual ou inferior a 4 horas, e a concentração do vapor saturado (SVC), a 20°C, seja inferior ou igual a um décimo;

b) Dados provenientes de fontes bem documentadas relativos aos seus efeitos no homem (por exemplo, narcose, sonolência, diminuição da vigília, perda de reflexos, descoordenação, vertigens), em condições de exposição comparáveis às que causam os efeitos supramencionados em animais.

V. também os pontos 1.6 e 1.7.

Para outras frases de risco suplementares v. o ponto 2.2.6.

4 Classificação com base em efeitos específicos na saúde humana

4.1 Introdução:

4.1.1 Este capítulo define o processo de classificação das substâncias que podem produzir os efeitos descritos a seguir.

4.1.2 Se um produtor, distribuidor ou importador dispuser de informações que indiquem que uma substância deve ser classificada e rotulada em conformidade com os critérios enunciados nos pontos 4.2.1, 4.2.2 ou 4.2.3, deve proceder à rotulagem provisória da substância de acordo com os referidos critérios, com base numa avaliação das evidências efectuada por uma entidade competente.

4.1.3 O produtor, distribuidor ou importador deve apresentar aos Estados membros em cujo mercado a substância seja colocada, tão breve quanto possível, um documento síntese com todas as informações relevantes sobre a mesma. O referido documento deve incluir uma bibliografia com todas as referências importantes, nomeadamente dados de relevo não publicados.

4.1.4 Além disso, um produtor, distribuidor ou importador que disponha de novos dados de relevo para a classificação e rotulagem de uma substância, em conformidade com os critérios estabelecidos nos pontos 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3, deve apresentar os referidos dados, tão breve quanto possível, aos Estados membros em cujo mercado a substância seja colocada.

4.1.5 A fim de se estabelecer, na Comunidade, tão rapidamente quanto possível, uma classificação harmonizada de acordo com o processo previsto no presente Regulamento, os Estados membros que disponham de informações relevantes que justifiquem a classificação de uma substância numa dessas categorias, fornecidas ou não pelo produtor, devem, o mais rapidamente possível, enviá-las à Comissão, acompanhadas de propostas de classificação e rotulagem.

A Comissão enviará a proposta de classificação e rotulagem recebida aos outros Estados membros. Qualquer Estado membro poderá solicitar à Comissão a comunicação das informações que lhe tenham sido apresentadas.

Qualquer Estado membro que tenha motivos válidos para admitir que as propostas de classificação e rotulagem sugeridas sejam inadequadas, no que diz respeito aos efeitos carcinogénicos, mutagénicos ou de toxicidade para a reprodução, deverá notificar a Comissão nesse sentido.

4.2 Critérios para a classificação, indicação de perigos e escolha de frases indicadoras de riscos:

4.2.1 Substâncias carcinogénicas:

No que diz respeito à classificação e rotulagem, e tendo em conta o estado actual dos conhecimentos, estas substâncias são divididas em três categorias:

1.^a categoria - substâncias conhecidas pelos seus efeitos carcinogénicos nos seres humanos. Existem elementos suficientes para estabelecer uma relação de causa-efeito entre a exposição dos seres humanos a tais substâncias e o desenvolvimento de cancro;

2.^a categoria - substâncias que devem ser equiparadas a substâncias carcinogénicas para os seres humanos. Existem elementos suficientes para que se justifique uma forte suspeita de que a exposição dos seres humanos a tais substâncias possa provocar o cancro, sendo essa suspeita estabelecida, em geral, com base em:

- estudos adequados a longo prazo em animais;
- outras informações relevantes;

3.^a categoria - substâncias que se receia possam ter efeitos carcinogénicos nos seres humanos mas em relação às quais as informações disponíveis não são suficientes para que possa ser feita uma avaliação satisfatória. Existem alguns elementos, obtidos em estudos adequados com animais, mas esses elementos não são suficientes para justificar a inclusão da substância na 2.^a categoria.

4.2.1.1 Serão utilizados os seguintes símbolos e frases indicadoras de risco específicas:

1.^a e 2.^a categorias:

T; R45 Pode causar cancro.

No entanto, no caso das substâncias e preparações que representem um risco de carcinogenicidade apenas quando inaladas, por exemplo, na forma de pó, vapor ou fumo (as outras vias de exposição, tais como a ingestão ou o contacto com a pele, não apresentam qualquer risco de carcinogenicidade), deverá utilizar-se o símbolo e a frase indicadora de risco específica que se seguem:

T; R49 Pode causar cancro por inalação.

3.^a categoria:

Xn; R40 Possibilidades de efeitos irreversíveis.

4.2.1.2 Comentários relativos à classificação das substâncias carcinogénicas em categorias:

A classificação de uma substância na 1.^a categoria efectua-se com base em dados epidemiológicos; a classificação nas 2.^a e 3.^a categorias baseia-se, fundamentalmente, em experiências em animais.

Para a classificação como carcinogénico na 2.^a categoria é necessário dispor de resultados positivos em duas espécies animais ou provas positivas claras obtidas numa espécie e elementos complementares, tais como dados de genotoxicidade, estudos metabólicos ou bioquímicos, indução de tumores benignos, relações estruturais com outros agentes carcinogénicos conhecidos ou dados provenientes de estudos epidemiológicos que sugiram qualquer associação.

A 3.^a categoria engloba, de facto, duas subcategorias:

a) Substâncias que foram suficientemente estudadas mas para as quais as provas de indução de tumores são insuficientes para justificar a classificação na 2.^a categoria. Admite-se que novas experiências não viessem a fornecer mais informações relevantes no que diz respeito à classificação;

b) Substâncias que não foram suficientemente estudadas. Os dados disponíveis não são adequados mas constituem motivo de preocupação. Esta classificação é provisória; é necessário efectuar mais experiências antes de se tomar uma decisão final.

Para estabelecer uma distinção entre as 2.^a e 3.^a categorias, são relevantes os argumentos que se apresentam a seguir, que reduzem o significado da indução experimental de tumores no que se refere a uma possível exposição dos seres humanos. Estes argumentos, especialmente quando combinados, conduzem, na maior parte dos casos, à classificação na 3.^a categoria, ainda que tenham sido induzidos tumores em animais:

- efeitos carcinogénicos apenas com doses muito elevadas que excedem a «dose máxima tolerada». A dose máxima tolerada caracteriza-se por efeitos tóxicos que, embora não reduzindo o período de vida, se manifestam em conjunto com modificações físicas, tais como uma redução de aproximadamente 10% no aumento de peso;

- formação de tumores, especialmente com doses muito elevadas, apenas em determinados órgãos de algumas espécies conhecidas por serem muito susceptíveis à formação espontânea de tumores;
- formação de tumores, apenas no local de aplicação, em sistemas de ensaio muito sensíveis (por exemplo, aplicação i. p. ou s. c. de alguns compostos localmente activos), se o alvo em causa não for relevante para os seres humanos;
- ausência de genotoxicidade em ensaios a curto prazo in vivo ou in vitro;
- existência de um mecanismo de acção secundário que apenas se manifesta acima de uma determinada dose limite (por exemplo, efeitos hormonais em órgãos alvo ou em mecanismos de regulação fisiológica ou estimulação crónica da proliferação celular);
- existência de um mecanismo de formação de tumores específico de uma determinada espécie (por exemplo, por percursos metabólicos específicos), irrelevante para os seres humanos.

Para uma distinção entre a 3.^a categoria e a ausência de classificação, são relevantes os seguintes argumentos, que excluem qualquer preocupação quanto aos seres humanos:

- uma substância não deve ser classificada em nenhuma das categorias se o mecanismo de formação experimental de tumores tiver sido claramente identificado, com provas seguras de que esse processo não pode ser extrapolado para os seres humanos;
- se os únicos dados disponíveis sobre tumores forem relativos aos tumores do fígado de algumas estirpes sensíveis de ratinhos, sem quaisquer outros elementos complementares, a substância não poderá ser classificada em nenhuma das categorias;
- deve-se prestar especial atenção aos casos em que os únicos dados disponíveis sobre tumores sejam a ocorrência de neoplasias locais e em estirpes onde se saiba que ocorrem espontaneamente com uma incidência elevada.

4.2.2 Substâncias mutagénicas:

4.2.2.1 No que diz respeito à classificação e rotulagem, e tendo em conta o estado actual dos conhecimentos, estas substâncias são divididas em três categorias:

1.^a categoria - substâncias conhecidas pelos seus efeitos mutagénicos nos seres humanos.

Existem elementos suficientes para se estabelecer uma relação de causa efeito entre a exposição dos seres humanos a tais substâncias e defeitos genéticos hereditários.

2.^a categoria - substâncias que devem ser equiparadas a substâncias mutagénicas para os seres humanos.

Existem elementos suficientes para que se justifique uma forte suspeita de que a exposição dos seres humanos a tais substâncias possa provocar defeitos genéticos hereditários, sendo essa suspeita estabelecida, em geral, com base em:

- estudos adequados em animais;
- outras informações relevantes.

3.^a categoria - substâncias que se receia possam ter efeitos mutagénicos nos seres humanos.

Existem elementos obtidos em estudos adequados de mutagenicidade, mas esses elementos são insuficientes para justificar a inclusão da substância na 2.^a categoria.

4.2.2.2 Serão utilizados os seguintes símbolos e frases indicadoras de risco específicas:

1.^a categoria:

T; R46 Pode causar alterações genéticas hereditárias.

2.^a categoria:

T; R46 Pode causar alterações genéticas hereditárias.

3.^a categoria:

Xn; R40 Possibilidades de efeitos irreversíveis.

4.2.2.3 Comentários relativos à classificação das substâncias mutagénicas em categorias:

Definição de termos:

Uma mutação consiste numa alteração permanente da quantidade ou da estrutura do material genético de um organismo, originando uma modificação das suas características fenotípicas. As alterações podem envolver um único gene, um bloco de genes ou um cromossoma inteiro. Os efeitos que envolvem genes isolados podem ser consequência de efeitos sobre uma única base do ADN (mutações pontuais) ou de grandes modificações no gene, incluindo deleções. Os efeitos num cromossoma inteiro podem envolver modificações estruturais ou numéricas. Uma mutação nas células germinativas em organismos que se reproduzem sexualmente pode ser transmitida à descendência. Um mutagénico é um agente que origina um aumento da ocorrência de mutações.

Refira-se que as substâncias são classificadas de mutagénicas considerando, especificamente, as lesões genéticas hereditárias. No entanto, o tipo de resultados que conduz à classificação das substâncias químicas na 3.^a categoria, «indução de fenómenos geneticamente relevantes em células somáticas», também é, em geral, considerado um aviso sobre possível actividade carcinogénica.

O desenvolvimento de um método para o ensaio da mutagenicidade é um processo contínuo. Para muitos ensaios novos não existem critérios de avaliação nem protocolos normalizados. Para a avaliação dos dados de mutagenicidade deve atender-se à qualidade da realização do ensaio e ao grau de validade do método.

1.^a categoria. - Para a classificação de uma substância na 1.^a categoria, é necessário dispor de provas positivas obtidas em estudos epidemiológicos de mutações em seres humanos. Até à data, não se conhecem exemplos deste tipo de substâncias. Reconhece-se que é extremamente difícil obter informações fiáveis a partir de estudos sobre a incidência de mutações em populações humanas ou sobre o possível aumento das suas frequências de ocorrência.

2.^a categoria. - Para a classificação de uma substância na 2.^a categoria, é necessário dispor de resultados positivos obtidos em experiências que demonstrem: a) efeitos mutagénicos; b) outras interacções celulares relevantes, do ponto de vista da mutagenicidade, em células germinativas de mamíferos in vivo; ou c) efeitos mutagénicos em células somáticas de mamíferos in vivo, juntamente com provas concludentes de que a substância ou um metabolito dela decorrente atinge as células germinativas.

No que diz respeito à classificação na 2.^a categoria, consideram-se actualmente adequados os seguintes métodos:

2 a) Ensaios de mutagenicidade em células germinativas efectuados in vivo:

- ensaio de mutação num locus específico;
- ensaio de translocação hereditária;
- ensaio de mutação letal dominante.

Estes ensaios demonstram, de facto, a manifestação de uma progenitura afectada ou de um defeito no embrião em desenvolvimento.

2 b) Ensaios in vivo que revelem uma interacção relevante com células germinativas (normalmente ADN):

- ensaios sobre anomalias cromossómicas, detectadas por análise citogenética, incluindo aneuploidia provocada por separação anómala de cromossomas;
- teste de permuta de cromátídeos irmãos (SCE);
- teste de síntese não programada do ADN (UDS);
- ensaio de ligação (covalente) do mutagénico ao ADN das células germinativas;
- ensaios para outros tipos de lesões do ADN.

Estes ensaios fornecem provas mais ou menos indirectas. Os resultados positivos obtidos nestes ensaios devem, em geral, ser confirmados por resultados positivos obtidos em ensaios de mutagenicidade em células somáticas, efectuados in vivo em mamíferos ou em seres humanos [v. na 3.^a categoria, de preferência, os métodos descritos em 3 a)].

2 c) Ensaios in vivo que demonstrem os efeitos mutagénicos em células somáticas de mamíferos [v. em 3 a)], juntamente com métodos toxicocinéticos, ou outras metodologias que possam demonstrar que o composto ou um metabolito dele decorrente atinge as células germinais.

Nas alíneas 2 b) e 2 c) os resultados positivos obtidos em ensaios com hospedeiros ou a demonstração de efeitos inequívocos em ensaios in vitro podem ser considerados provas suplementares.

3.^a categoria. - Para a classificação de uma substância na 3.^a categoria são necessários resultados positivos, obtidos em ensaios, que demonstrem: a) efeitos mutagénicos; ou b) outras interações celulares relevantes do ponto de vista da mutagenicidade, em células somáticas de mamíferos in vivo. Em particular, este último caso deverá, normalmente, ser confirmado por resultados positivos obtidos em ensaios de mutagenicidade in vitro.

Para a verificação de efeitos em células somáticas in vivo, consideram-se actualmente adequados os seguintes métodos:

3 a) Ensaios de mutagenicidade em células somáticas in vivo:

- teste do micronúcleo da medula óssea ou análise da metafase;
- análise da metafase de linfócitos periféricos;
- teste das malhas de cor no pêlo do ratinho.

3 b) Ensaios de interacção no ADN de células somáticas in vivo:

- teste para observação de permuta de cromátídeos irmãos (SCE) em células somáticas;
- teste para observação de síntese não programada do ADN (UDS) em células somáticas;
- ensaio para observação da ligação (covalente) do mutagénico ao ADN das células somáticas;
- ensaio para observação de lesões do ADN, por exemplo por eluição alcalina, em células somáticas.

As substâncias que apresentem resultados positivos apenas num ou mais ensaios de mutagenicidade in vitro não deverão, normalmente, ser classificadas. No entanto, recomenda-se vivamente que sejam submetidas a investigações complementares, recorrendo a ensaios in vivo. Em casos excepcionais, por exemplo, no caso de uma substância que provoque respostas importantes em diversos ensaios in vivo, para a qual não existam dados significativos obtidos in vivo e que revele afinidades com mutagénicos/carcinogénicos conhecidos, pode encarar-se a possibilidade de o classificar na 3.^a categoria.

4.2.3 Substâncias com efeitos tóxicos na reprodução:

4.2.3.1 No que diz respeito à classificação e rotulagem, e tendo em conta o estado actual do conhecimento, estas substâncias são divididas em três categorias:

1.^a categoria:

Substâncias que, comprovadamente, causam anomalias da fertilidade humana. - Existem elementos suficientes para se estabelecer uma relação de causa-efeito entre a exposição dos seres humanos a tais substâncias e as anomalias na fertilidade.

Substâncias que, comprovadamente, têm efeitos tóxicos no desenvolvimento dos seres humanos. - Existem elementos suficientes para se estabelecer uma relação de causa-efeito entre a exposição dos seres humanos a tais substâncias e os efeitos tóxicos daí decorrentes no desenvolvimento da prole.

2.^a categoria:

Substâncias que devem ser equiparadas a substâncias que causam anomalias da fertilidade humana. - Existem elementos suficientes para que se justifique uma forte suspeita de que a exposição dos seres humanos a tais substâncias possa causar anomalias da fertilidade, estabelecida com base em:

- provas concludentes, obtidas em ensaios com animais, de anomalias da fertilidade, sem que se manifestem efeitos tóxicos, ou provas da existência de anomalias da fertilidade para doses

próximas das que provocam outros efeitos tóxicos, sem que essas anomalias sejam uma consequência secundária, não específica, desses efeitos tóxicos;

- outras informações relevantes.

Substâncias que devem ser equiparadas a substâncias que têm efeitos tóxicos no desenvolvimento dos seres humanos. - Existem elementos suficientes para que se justifique uma forte suspeita de que a exposição dos seres humanos a tais substâncias possa ter efeitos tóxicos no desenvolvimento, estabelecida em geral com base em:

- resultados concludentes obtidos em estudos apropriados com animais, em que se observaram efeitos na ausência de sinais de toxicidade materna acentuada ou para doses próximas das que provocaram outros efeitos tóxicos mas sem que, neste caso, sejam uma consequência secundária, não específica, desses efeitos tóxicos;

- outras informações relevantes.

3.^a categoria:

Substâncias que suscitam preocupações quanto aos seus efeitos na fertilidade humana. - Em geral, com base em:

- resultados obtidos em estudos apropriados em animais que constituem motivo suficiente para justificar fortes suspeitas quanto à existência de anomalias da fertilidade, na ausência de efeitos tóxicos, ou provas da existência de anomalias da fertilidade para doses próximas das que provocam outros efeitos tóxicos, sem que essas anomalias sejam uma consequência secundária, não específica, desses efeitos tóxicos, mas que são insuficientes para justificar a inclusão da substância na 2.^a categoria;

- outras informações relevantes.

Substâncias que suscitam preocupações quanto à possibilidade de ocorrência de efeitos tóxicos no desenvolvimento dos seres humanos. - Em geral, com base em:

- resultados obtidos em estudos apropriados em animais que constituem motivo suficiente para justificar fortes suspeitas quanto à existência de efeitos tóxicos no desenvolvimento, na ausência de sinais de toxicidade materna acentuada, ou efeitos observados para doses próximas das que provocam outros efeitos tóxicos, sem que sejam uma consequência secundária, não específica, desses efeitos tóxicos, mas que são insuficientes para justificar a inclusão da substância na 2.^a categoria;

- outras informações relevantes.

4.2.3.2 Serão utilizados os seguintes símbolos e frases indicadoras de risco específicas:

1.^a categoria:

Substâncias que causam anomalias da fertilidade humana:

T; R60 Pode comprometer a fertilidade.

Substâncias com efeitos tóxicos no desenvolvimento:

T; R61 Risco durante a gravidez com efeitos adversos na descendência.

2.^a categoria:

Substâncias que devem ser equiparadas a substâncias que causam anomalias da fertilidade humana:

T; R60 Pode comprometer a fertilidade.

Substâncias que devem ser equiparadas a substâncias com efeitos tóxicos no desenvolvimento dos seres humanos:

T; R61 Risco durante a gravidez com efeitos adversos na descendência.

3.^a categoria:

Substâncias que suscitam preocupações quanto ao seu efeito na fertilidade humana:

Xn; R62 Possíveis riscos de comprometer a fertilidade.

Substâncias que suscitam preocupações quanto à possibilidade de ocorrência de efeitos tóxicos no desenvolvimento dos seres humanos:

Xn; R63 Possíveis riscos durante a gravidez de efeitos indesejáveis na descendência.

4.2.3.3 Comentários relativos à classificação das substâncias tóxicas para a reprodução em categorias:

A toxicidade para a reprodução inclui a perturbação das funções ou capacidades reprodutoras masculina ou feminina e a indução de efeitos nocivos não hereditários na progenitura. A classificação pode ser feita com base em dois grupos principais: 1) Efeitos na fertilidade masculina ou feminina; e 2) efeitos tóxicos no desenvolvimento.

1) Os efeitos na fertilidade masculina ou feminina compreendem efeitos nocivos no líbido, no comportamento sexual, em qualquer aspecto da espermatogénese ou da oogenese ou nas actividades hormonais ou respostas fisiológicas que interfiram na capacidade de fertilizar, na própria fertilização ou no desenvolvimento do ovo até à fase de implantação, inclusive.

2) Os efeitos tóxicos no desenvolvimento são entendidos no seu sentido mais lato, compreendendo qualquer efeito que interfira no desenvolvimento normal, antes ou depois do nascimento. Abrange efeitos induzidos ou manifestados no período pré-natal e efeitos manifestados no período pós-natal, o que inclui efeitos tóxicos para o embrião/feto, tais como redução do peso corporal, atrasos do crescimento e do desenvolvimento, toxicidade orgânica, morte, aborto, anomalias estruturais (efeitos teratogénicos), perturbações funcionais, anomalias perinatais e pós-natais e perturbações do desenvolvimento físico e mental pós-natal até à puberdade, inclusive.

A classificação «com efeitos tóxicos na reprodução» deve ser atribuída às substâncias e preparações químicas nos casos em que estas possuam propriedades intrínsecas ou específicas que se traduzam em efeitos tóxicos desse tipo. Nos casos em que esses efeitos sejam apenas uma consequência secundária, não específica, de outros efeitos tóxicos, as substâncias e preparações químicas não deverão ser classificadas de tóxicas para a reprodução. As substâncias e preparações químicas mais preocupantes são as que se revelam tóxicas para a reprodução a níveis de exposição que não produzem outros sinais de toxicidade.

A inclusão de um composto na 1.^a categoria, devido aos seus efeitos na fertilidade e ou aos seus efeitos tóxicos no desenvolvimento, é feita com base em dados epidemiológicos. A inclusão nas 2.^a e 3.^a categorias é feita, sobretudo, com base em dados obtidos em animais. Os dados obtidos em estudos in vitro ou os estudos com ovos de aves são considerados «confirmações» e só poderão fundamentar uma classificação, excepcionalmente, se não existirem dados in vivo.

Em comum com a maior parte dos outros tipos de efeitos tóxicos, é de esperar que as substâncias que revelem toxicidade para a reprodução não manifestem os seus efeitos nocivos abaixo de um determinado limite. Mesmo quando tenha sido demonstrada a existência de efeitos claros em estudos com animais, a sua relevância para o caso dos seres humanos pode não ser segura, dadas as doses administradas. É o caso, por exemplo, de efeitos cuja existência tenha sido demonstrada apenas para doses elevadas, quando existam diferenças toxicocinéticas importantes ou quando a via de administração for inadequada. Por estas e outras razões do mesmo tipo, pode suceder que seja atribuída a classificação na 3.^a categoria ou que nenhuma classificação seja atribuída.

O anexo V do presente Regulamento especifica um teste limite para o caso das substâncias de baixa toxicidade. Se uma dose de, pelo menos, 1000 mg/kg, por via oral, não der origem à manifestação de efeitos tóxicos na reprodução, estudos envolvendo outras doses podem ser considerados desnecessários. Se existirem dados de estudos efectuados com doses superiores à dose limite referida, tais dados devem ser avaliados juntamente com outros dados relevantes. Em circunstâncias normais, considera-se que os efeitos manifestados apenas perante doses superiores à dose limite não implicarão, necessariamente, a classificação «com efeitos tóxicos na reprodução».

Efeitos na fertilidade

Para que uma substância seja classificada na 2.^a categoria, devido a perturbações da fertilidade, deverão existir, normalmente, elementos inequívocos, obtidos numa espécie animal, fundamentados num mecanismo de acção ou num local de actuação, uma relação de tipo químico com outros agentes com efeitos comprovadamente antifertilidade ou outras informações, obtidas em seres humanos, que permitam concluir ser provável que esses efeitos se manifestem nos seres humanos. Nos casos em que apenas tenham sido efectuados estudos numa espécie, sem que existam outros elementos relevantes que confirmem os resultados desses estudos, poderá classificar-se a substância na 3.^a categoria.

Uma vez que as perturbações da fertilidade poderão ocorrer em associação, não específica, com toxicidade generalizada intensa, a classificação na 2.^a categoria só deverá ser atribuída quando, comprovadamente, existir um certo grau de especificidade dos efeitos tóxicos relativamente ao sistema reprodutor. Caso tenha sido demonstrado que as perturbações da fertilidade verificadas em estudos com animais foram devidas a incapacidade de acasalamento, para estabelecer uma classificação na 2.^a categoria, será, em geral, necessário conhecer o mecanismo de acção, de modo a poder determinar-se se efeitos adversos, como alterações do tipo de secreção hormonal, poderão ocorrer, ou não, nos seres humanos.

Efeitos tóxicos no desenvolvimento

Para estabelecer uma classificação na 2.^a categoria, deve-se dispor de provas concludentes da existência de efeitos nocivos, obtidas em estudos bem conduzidos numa ou mais espécies. Uma vez que os efeitos nocivos na gravidez ou no período pós-natal poderão ser uma consequência secundária de toxicidade materna, reduzida ingestão de alimentos ou de água, stress materno, falta de cuidados maternos, deficiências dietéticas específicas, condições deficientes para a criação dos animais, infecções intercorrentes ou de outras situações, é importante que os efeitos observados ocorram durante estudos bem conduzidos e com doses a que não esteja associada toxicidade materna acentuada. A via de exposição também é importante. Nomeadamente, a injeção intraperitoneal do material irritante pode provocar lesões localizadas do útero e do seu conteúdo, devendo os resultados destes estudos ser interpretados com precaução, não implicando, em geral, por si só, a atribuição de uma determinada classificação.

A classificação na 3.^a categoria fundamenta-se em critérios semelhantes aos correspondentes à 2.^a categoria mas poderá ser atribuída nos casos em que a concepção das experiências enfebre de deficiências que tornem as conclusões pouco credíveis, ou nos casos em que não possa excluir-se a possibilidade de os efeitos serem devidos a factores inespecíficos, por exemplo, toxicidade generalizada.

Em geral, será estabelecida uma classificação ad hoc na 3.^a categoria ou não será estabelecida nenhuma classificação nos casos em que os únicos efeitos observados forem pequenas alterações na incidência de anomalias idiopáticas, pequenas alterações na ocorrência de variantes comuns, como as observadas nos exames esqueléticos, ou pequenas variações nos exames do desenvolvimento pós-natal.

Efeitos durante o aleitamento

As substâncias a que tenha sido atribuída a classificação «com efeitos tóxicos na reprodução» e que suscitem preocupações quanto aos seus efeitos na lactação, deverão, complementarmente, ser rotuladas com a frase R64 (v. os critérios que constam do ponto 3.2.8).

Para fins de classificação, os efeitos tóxicos na progenitura que resultem, exclusivamente, de exposição pela via do leite materno ou os efeitos tóxicos que resultem de exposição directa das crianças não serão considerados «efeitos tóxicos na reprodução», salvo quando se traduzam em anomalias do desenvolvimento da progenitura.

As substâncias que não sejam classificadas «com efeitos tóxicos na reprodução» mas cuja toxicidade possa ser motivo de preocupação por transferência para a criança durante o período

de aleitamento, deverão ser rotuladas com a frase R64 (v. os critérios correspondentes ao parágrafo 3.2.8). Esta frase R também poderá adequar-se às substâncias que afectem a quantidade ou a qualidade do leite.

Em geral, a frase R64 será atribuída com base em:

- a) Estudos de toxicocinética que revelem a possibilidade de a substância estar presente no leite materno em níveis potencialmente tóxicos;
- b) Resultados de estudos de uma ou duas gerações em animais que revelem a existência de efeitos nocivos na prole, devidos a transferências pelo leite;
- c) Ou risco para as crianças durante o período de aleitamento, comprovado em seres humanos.

As substâncias que, comprovadamente, se acumulem no corpo e que, subsequentemente, possam passar para o leite durante a lactação, poderão ser rotuladas com a R33 e a R64.

4.2.4 Processo para a classificação de preparações, no que se refere aos efeitos específicos na saúde:

Se uma preparação contiver uma ou mais substâncias classificadas tendo em conta os critérios acima estabelecidos, deve ser classificada de acordo com os critérios referidos no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho (os limites de concentração são fixados no anexo I da presente portaria ou no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, nos casos em que desde que a substância ou as substâncias não figurem no anexo I do presente Regulamento ou nele figurem mas sem limites de concentração).

5 Classificação com base em efeitos no ambiente

5.1 Introdução:

O principal objectivo da classificação das substâncias e preparações como perigosas para o ambiente é alertar o utilizador para os perigos que essas substâncias representam para os ecossistemas. Embora os critérios actuais se refiram aos ecossistemas aquáticos, sabe-se que algumas substâncias podem afectar, simultânea ou alternativamente, outros ecossistemas cujos constituintes podem ir desde a microflora e a microfauna do solo até aos primatas.

Os critérios adiante definidos decorrem directamente dos métodos de ensaio especificados no anexo V, desde que sejam mencionados. Os métodos de ensaio necessários para o «dossier de base» referido no anexo VII são limitados e as informações obtidas por aplicação desses métodos podem ser insuficientes para uma classificação adequada. Para a classificação, poderão ser necessários dados suplementares (nível 1, anexo VIII) ou outros estudos equivalentes. Além disso, a classificação das substâncias poderá ser reexaminada à medida que se dispuser de novos dados.

Para efeitos de classificação e rotulagem, e tendo em conta o estado actual do conhecimento, estas substâncias são divididas em dois grupos, de acordo com os seus efeitos agudo e ou a longo prazo em sistemas aquáticos ou de acordo com os seus efeitos agudo e ou a longo prazo em sistemas não aquáticos.

5.2 Critérios para a classificação, indicações de perigo e escolha de frases indicadoras de riscos:

5.2.1 Ambiente aquático:

5.2.1.1 As substâncias serão classificadas de perigosas para o ambiente e caracterizadas pelo símbolo «N», pela indicação de perigo «perigoso para o ambiente» e por frases indicadoras de risco de acordo com os critérios a seguir definidos:

R50 Muito tóxico para os organismos aquáticos

e

R53 Pode causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático.

Toxicidade aguda: CL(índice 50) às 96 h (nos peixes) $\leq$ 1 mg/l;

ou CE(índice 50) às 48 h (nos Daphnia) ≤ 1 mg/l;

ou CI(índice 50) às 72 h (nas algas) ≤ 1 mg/l;

e

- a substância não é facilmente degradável;

ou

- o log P(índice oa) (log do coeficiente de partição octanol/água) $\geq 3,0$ (salvo se o coeficiente de bioconcentração, BCF, determinado experimentalmente for ≤ 100).

R50 Muito tóxico para os organismos aquáticos.

Toxicidade aguda: CL(índice 50) às 96 h (nos peixes) ≤ 1 mg/l;

ou CE(índice 50) às 48 h (nos Daphnia) ≤ 1 mg/l;

ou CI(índice 50) às 72 h (nas algas) ≤ 1 mg/l.

R51 Tóxico para os organismos aquáticos

e

R53 Pode causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático.

Toxicidade aguda: CL(índice 50) às 96 h (nos peixes) $1 \text{ mg/l} < \text{CL(índice 50)} \leq 10 \text{ mg/l}$;

ou CE(índice 50) às 48 h (nos Daphnia) $1 \text{ mg/l} < \text{CE(índice 50)} \leq 10 \text{ mg/l}$;

ou CI(índice 50) às 72 h (nas algas) $1 \text{ mg/l} < \text{CI(índice 50)} \leq 10 \text{ mg/l}$;

e

- a substância não é facilmente degradável;

ou

- o log P(índice oa), $\geq 3,0$ (excepto se o coeficiente de bioconcentração, BCF, determinado experimentalmente for ≤ 100).

5.2.1.2 As substâncias serão classificadas de perigosas para o ambiente de acordo com os critérios seguintes. As frases indicadoras de risco também serão atribuídas de acordo com os critérios a seguir definidos:

R52 Nocivo para os organismos aquáticos

e

R53 Pode causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático.

Toxicidade aguda: CL(índice 50) às 96 h (nos peixes) $10 \text{ mg/l} < \text{CL(índice 50)} \leq 100 \text{ mg/l}$;

ou CE(índice 50) às 48 h (nos Daphnia) $10 \text{ mg/l} < \text{CE(índice 50)} \leq 100 \text{ mg/l}$;

ou CI(índice 50) às 72 h (nas algas) $10 \text{ mg/l} < \text{CI(índice 50)} \leq 100 \text{ mg/l}$;

e a substância não é facilmente degradável.

Este será o critério aplicado, salvo se existirem outros elementos de carácter científico, relativos à degradação e ou toxicidade, suficientes para garantir que nem a substância nem os produtos da sua degradação poderão constituir um perigo potencial a longo prazo e ou retardado para o ambiente aquático. Normalmente esses elementos científicos suplementares basear-se-ão nos estudos exigidos pelo nível 1 (anexo VIII) ou em estudos equivalentes, podendo incluir:

i) Prova de potencial comprovado de degradação rápida no ambiente aquático;

ii) Ausência de efeitos de toxicidade crónica para um valor de concentração de $1,0 \text{ mg/l}$, por exemplo uma concentração sem efeito observável superior a $1,0 \text{ mg/l}$, determinada num estudo prolongado de toxicidade efectuado em peixes ou em Daphnia.

R52 Nocivo para os organismos aquáticos:

Substâncias que não são abrangidas pelos critérios precedentes deste capítulo mas que, com base nos elementos disponíveis relativos à sua toxicidade, possam, ainda assim, constituir um perigo para a estrutura e ou para o funcionamento dos ecossistemas aquáticos.

R53 Pode causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático:

Substâncias que não são abrangidas pelos critérios precedentes deste capítulo mas que, com base nos elementos disponíveis relativos à sua persistência, potencial acumulação e comportamento e destino previstos ou observados no ambiente, possam, ainda assim,

constituir um perigo a longo prazo e ou retardado para a estrutura e ou para o funcionamento dos ecossistemas aquáticos.

Por exemplo, as substâncias pouco solúveis em água, isto é, as substâncias com uma solubilidade inferior a 1 mg/l, serão abrangidas por este critério se:

- a) Não forem facilmente degradáveis; e
- b) O $\log P(\text{índice } oa) \geq 3,0$ (excepto se o coeficiente de bioconcentração, BCF, determinado experimentalmente for ≤ 100).

Este será o critério aplicado, salvo se existirem outros elementos de carácter científico, relativos à degradação e ou toxicidade, suficientes para garantir que nem a substância nem os produtos da sua degradação poderão constituir um perigo potencial a longo prazo e ou retardado para o ambiente aquático.

Normalmente esses elementos científicos suplementares basear-se-ão nos estudos exigidos pelo nível 1 (anexo VIII) ou em estudos equivalentes, podendo incluir:

- i) Prova de potencial comprovado de degradação rápida no ambiente aquático;
- ii) Ausência de efeitos de toxicidade crónica no limite de solubilidade, por exemplo, uma concentração sem efeito observável superior ao limite de solubilidade, determinada num estudo prolongado de toxicidade efectuado em peixes ou em *Daphnia*.

5.2.1.3 Comentários relativos à determinação da CI(índice 50) em algas e à degradação fácil:

- se, no caso das substâncias fortemente coradas, puder ser demonstrado que a inibição do crescimento das algas é devida, exclusivamente, à redução da intensidade da luz, então a CI(índice 50) às 72 horas, para algas, não deverá ser utilizada como base de classificação.
- as substâncias serão consideradas facilmente degradáveis se forem respeitados os seguintes critérios:

- a) Se, em estudos de biodegradação de 28 dias, forem atingidos os seguintes níveis de degradação:

- 70%, em ensaios baseados no carbono orgânico dissolvido;
- 60% do máximo teórico, em ensaios baseados no consumo de oxigénio ou na produção de dióxido de carbono.

Estes níveis de biodegradação deverão ser obtidos até 10 dias após o início da degradação, ponto considerado como o tempo de degradação de 10% da substância; ou

- b) Se, nos casos em que apenas existam dados de CQO e CBO(índice 5), a relação CBO(índice 5)/CQO for superior ou igual a 0,5; ou
- c) Se existirem outros elementos concludentes de carácter científico que demonstrem que a substância pode ser degradada (biótica e ou abioticamente) no ambiente aquático, em mais de 70%, num período de 28 dias.

5.2.2 Ambiente não aquático:

5.2.2.1 As substâncias serão classificadas como perigosas para o ambiente e caracterizadas pelo símbolo «N», pela indicação de perigo adequada e por frases indicadoras de risco de acordo com os critérios a seguir definidos:

R54 Tóxico para a flora;

R55 Tóxico para a fauna;

R56 Tóxico para os organismos do solo;

R57 Tóxico para as abelhas;

R58 Pode causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente.

Substâncias que, com base nos elementos disponíveis relativos à sua toxicidade, persistência, acumulação potencial, bem como comportamento e destino previsíveis ou observados no ambiente, possam constituir um perigo imediato ou a longo prazo e ou retardado para a estrutura e ou para o funcionamento dos ecossistemas naturais, diferente dos abrangidos pelo ponto 5.2.1 supra. Posteriormente, serão elaborados critérios mais pormenorizados.

5.2.2.2 As substâncias e preparações serão classificadas como perigosas para o ambiente e caracterizadas pelo símbolo «N», pela indicação de perigo adequada e por frases indicadoras de risco de acordo com os critérios a seguir definidos:

R59 Perigoso para a camada de ozono.

Substâncias que, com base nos elementos disponíveis relativos às suas propriedades, bem como ao seu comportamento e destino previsíveis ou observados no ambiente, possam constituir um perigo para a estrutura e ou para o funcionamento da camada de ozono da estratosfera. Incluem-se as substâncias enumeradas no anexo I do Regulamento (CE) n.º 3093/94, do Conselho, relativo a substâncias que empobrecem a camada de ozono (JO, L 333, de 22 de Dezembro de 1994, p. 1) e suas alterações subsequentes.

6 Escolha das recomendações de prudência

6.1 Introdução:

As recomendações de prudência (frases S) serão atribuídas às substâncias e preparações perigosas de acordo com os critérios gerais a seguir definidos. Além disso, no caso de determinadas preparações, as recomendações de prudência do Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, são obrigatórias.

Sempre que se refira o produtor no capítulo 6 estará a fazer-se referência à pessoa responsável pela colocação da substância ou preparação no mercado.

6.2 Frases de segurança aplicáveis às substâncias e preparações perigosas:

S1 Guardar fechado à chave:

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações muito tóxicas, tóxicas ou corrosivas.

- Critérios de utilização:

- obrigatória para as substâncias e preparações atrás referidas, vendidas ao público em geral.

S2 Manter fora do alcance das crianças:

- Âmbito de aplicação:

- todas as substâncias e preparações perigosas.

- Critérios de utilização:

- obrigatória para todas as substâncias e preparações perigosas vendidas ao público em geral que não tenham sido apenas classificadas de perigosas para o ambiente.

S3 Guardar em lugar fresco:

- Âmbito de aplicação:

- peróxidos orgânicos;

- outras substâncias e preparações perigosas com ponto de ebulição $\leq 40^{\circ}\text{C}$.

- Critérios de utilização:

- obrigatória para os peróxidos orgânicos, excepto no caso da utilização da frase S47;

- recomendada para outras substâncias e preparações perigosas com ponto de ebulição $\leq 40^{\circ}\text{C}$.

S4 Manter fora de qualquer zona de habitação:

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações muito tóxicas e tóxicas.

- Critérios de utilização:

- geralmente limitada a substâncias e preparações muito tóxicas e tóxicas, como complemento da frase S13 em casos adequados, nomeadamente quando existam riscos de inalação e a substância ou preparação deva ser armazenada em locais distantes das zonas habitacionais. Esta indicação não tem por objectivo excluir a utilização adequada dessas substâncias ou preparações em zonas habitacionais.

S5 Manter sob ... (líquido apropriado a especificar pelo produtor):

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações sólidas que se inflamem espontaneamente.
- Critérios de utilização:
- limitada, normalmente, a casos especiais, por exemplo, sódio, potássio ou fósforo branco.

S6 Manter sob ... (gás inerte a especificar pelo produtor):

- Âmbito de aplicação:
- substâncias e preparações perigosas que devam ser mantidas numa atmosfera inerte.
- Critérios de utilização:
- limitada, normalmente, a casos especiais, por exemplo, determinados compostos organometálicos.

S7 Manter o recipiente bem fechado:

- Âmbito de aplicação:
- peróxidos orgânicos;
- substâncias e preparações que possam libertar gases muito tóxicos, tóxicos, nocivos ou extremamente inflamáveis;
- substâncias e preparações que, por absorção de humidade, libertem gases extremamente inflamáveis;
- sólidos facilmente inflamáveis.
- Critérios de utilização:
- obrigatória para os peróxidos orgânicos;
- recomendada para os restantes âmbitos de aplicação referidos.

S8 Manter o recipiente ao abrigo da humidade:

- Âmbito de aplicação:
- substâncias e preparações que possam reagir violentamente com a água;
- substâncias e preparações que, em contacto com a água, libertem gases extremamente inflamáveis;
- substâncias e preparações que, em contacto com a água, libertem gases muito tóxicos.
- Critérios de utilização:
- limitada, normalmente, aos âmbitos de aplicação supra-referidos, quando é necessário reforçar as indicações de risco das frases R14 e R15 em particular, mas também da R29.

S9 Manter o recipiente num local bem ventilado:

- Âmbito de aplicação:
- substâncias e preparações voláteis que possam libertar vapores muito tóxicos, tóxicos ou nocivos;
- líquidos extremamente inflamáveis ou muito inflamáveis e gases extremamente inflamáveis.
- Critérios de utilização:
- recomendada para as substâncias e preparações voláteis que possam libertar vapores muito tóxicos, tóxicos ou nocivos;
- recomendada para líquidos extremamente inflamáveis ou muito inflamáveis ou gases extremamente inflamáveis.

S12 Não fechar o recipiente hermeticamente:

- Âmbito de aplicação:
- substâncias e preparações que possam provocar a explosão do recipiente, por libertação de gases ou vapores.
- Critérios de utilização:
- limitada, normalmente, aos casos especiais acima referidos.

S13 Manter afastado de alimentos e bebidas, incluindo os dos animais:

- Âmbito de aplicação:
- substâncias e preparações muito tóxicas, tóxicas e nocivas.
- Critérios de utilização:

- recomendada para substâncias e preparações que possam ser utilizadas pelo público em geral.

S14 Manter ao abrigo de ... (matérias incompatíveis a indicar pelo produtor):

- Âmbito de aplicação:

- peróxidos orgânicos

- Critérios de utilização:

- obrigatória para os peróxidos orgânicos e normalmente limitada aos mesmos. Contudo, pode ser útil em casos excepcionais, se a incompatibilidade produzir riscos específicos.

S15 Manter afastado do calor:

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações que possam decompor-se ou reagir espontaneamente sob a acção do calor.

- Critérios de utilização:

- limitada, normalmente, a casos especiais, como os monómeros, não sendo atribuídas se as frases indicadoras de risco R2, R3 e ou R5 já tiverem sido aplicadas.

S16 Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição - Não fumar:

- Âmbito de aplicação:

- líquidos extremamente inflamáveis ou muito inflamáveis e gases extremamente inflamáveis.

- Critérios de utilização:

- recomendada para as substâncias e preparações referidas, não sendo atribuída se as frases indicadoras de risco R2, R3 e ou R5 já tiverem sido aplicadas.

S17 Manter afastado de matérias combustíveis:

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações que possam constituir misturas explosivas ou espontaneamente inflamáveis com matérias combustíveis.

- Critérios de utilização:

- a utilizar em casos especiais, por exemplo para reforçar as frases R8 e R9.

S18 Manipular e abrir o recipiente com prudência:

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações que possam produzir uma sobrepressão no recipiente;

- substâncias e preparações que possam dar origem a peróxidos explosivos.

- Critérios de utilização:

- normalmente limitada aos casos atrás referidos, sempre que existam riscos de danos para os olhos e ou as substâncias e preparações possam ser utilizadas pelo público em geral.

S20 Não comer nem beber durante a utilização:

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações muito tóxicas, tóxicas ou corrosivas.

- Critérios de utilização:

- normalmente limitada a casos especiais (por exemplo, arsénio e compostos de arsénio; fluoroacetatos), em particular substâncias e preparações que possam ser utilizadas pelo público em geral.

S21 Não fumar durante a utilização:

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações cuja combustão origine produtos tóxicos.

- Critérios de utilização:

- limitada, normalmente, a casos especiais (por exemplo, compostos halogenados).

S22 Não respirar as poeiras:

- Âmbito de aplicação:

- todas as substâncias e preparações sólidas perigosas para a saúde.

- Critérios de utilização:

- obrigatória para todas as substâncias e preparações atrás referidas a que tenha sido atribuída a frase R42;

- recomendada para as substâncias e preparações atrás referidas fornecidas numa forma pulverulenta inalável e cujos riscos para a saúde na sequência da inalação se desconhecem.

S23 Não respirar os gases/vapores/fumos/aerossóis [termo(s) apropriado(s) a indicar pelo produtor]:

- Âmbito de aplicação:

- todas as substâncias e preparações líquidas e gasosas perigosas para a saúde.

- Critérios de utilização:

- obrigatória para substâncias e preparações atrás referidas a que tenha sido atribuída a frase R42;

- obrigatória para substâncias e preparações destinadas a utilização por pulverização. Como complemento, devem prescrever-se as frases S38 ou S51;

- recomendada quando seja necessário chamar a atenção do utilizador para riscos decorrentes da inalação não referidos nas frases indicadoras de risco atribuídas.

S24 Evitar o contacto com a pele:

- Âmbito de aplicação:

- todas as substâncias e preparações perigosas para a saúde.

- Critérios de utilização:

- obrigatória para todas as substâncias e preparações a que tenha sido atribuída a frase R43, salvo se tiver sido também atribuída a frase S36;

- recomendada quando seja necessário chamar a atenção do utilizador para riscos decorrentes do contacto com a pele (por exemplo, parestesia) não referidos nas frases indicadoras de risco atribuídas. No entanto, poderá ser utilizada para reforçar tais frases.

S25 Evitar o contacto com os olhos:

- Âmbito de aplicação:

- todas as substâncias e preparações perigosas para a saúde.

- Critérios de utilização:

- recomendada quando seja necessário chamar a atenção do utilizador para riscos decorrentes do contacto com os olhos, não referidos nas frases indicadoras de risco obrigatórias. No entanto, poderá ser utilizada para reforçar tais frases;

- recomendada para substâncias e preparações corrosivas às quais tenham sido atribuídas as frases R34, R35, R36 ou R41 que possam ser utilizadas pelo público em geral.

S26 Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista:

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações corrosivas ou irritantes.

- Critérios de utilização:

- obrigatória para as substâncias e preparações corrosivas a que tenha sido atribuída a frase R41;

- recomendada para as substâncias e preparações irritantes a que tenha já sido atribuída a frase R36.

S27 Retirar imediatamente todo o vestuário contaminado:

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações muito tóxicas, tóxicas ou corrosivas.

- Critérios de utilização:

- obrigatória para substâncias e preparações muito tóxicas a que tenha sido atribuída a frase R27 e que possam ser utilizadas pelo público em geral;

- recomendada para substâncias e preparações muito tóxicas, utilizadas na indústria, a que tenha sido atribuída a frase R27. Contudo, esta frase de segurança não deve ser utilizada se tiver sido atribuída a frase S36;

- recomendada para substâncias e preparações tóxicas a que tenha sido atribuída a frase R24, bem como para substâncias e preparações corrosivas que possam ser utilizadas pelo público em geral.

S28 Após contacto com a pele lavar imediata e abundantemente com ... (produtos adequados a especificar pelo produtor):

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações muito tóxicas, tóxicas ou corrosivas.

- Critérios de utilização:

- obrigatória para substâncias e preparações muito tóxicas;

- recomendada para as restantes substâncias e preparações supra-referidas, em especial quando a água não for o fluido de lavagem mais indicado;

- recomendada para substâncias e preparações corrosivas que possam ser utilizadas pelo público em geral.

S29 Não deitar os resíduos no esgoto:

- Âmbito de aplicação:

- líquidos extremamente inflamáveis ou muito inflamáveis imiscíveis com a água;

- substâncias e preparações muito tóxicas e tóxicas;

- substâncias perigosas para o ambiente.

- Critérios de utilização:

- obrigatória para substâncias perigosas para o ambiente e caracterizadas pelo símbolo «N», que possam ser utilizadas pelo público em geral, excepto se for essa a sua previsível utilização;

- recomendada para as outras substâncias e preparações supra-referidas que possam ser utilizadas pelo público em geral, excepto se for essa a sua previsível utilização.

S30 Nunca adicionar água a este produto:

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações que reajam violentamente com a água.

- Critérios de utilização:

- normalmente limitada a casos especiais (por exemplo, ácido sulfúrico); pode ser utilizada, se adequado, para fornecer informações tão claras quanto possível, tanto para reforçar a frase R14 ou como alternativa à frase R14.

S33 Evitar acumulação de cargas electrostáticas:

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações extremamente inflamáveis ou muito inflamáveis.

- Critérios de utilização:

- recomendada para substâncias e preparações utilizadas na indústria que não absorvam humidade. Praticamente nunca utilizada para substâncias e preparações colocadas no mercado para utilização pelo público em geral.

S35 Este produto e o seu recipiente devem ser eliminados de modo seguro:

- Âmbito de aplicação:

- todas as substâncias e preparações perigosas.

- Critérios de utilização:

- recomendada para substâncias e preparações cuja eliminação adequada necessite de directrizes específicas.

S36 Usar vestuário de protecção adequado:

- Âmbito de aplicação:

- peróxidos orgânicos;

- substâncias e preparações muito tóxicas, tóxicas ou nocivas;
- substâncias e preparações corrosivas.
- Critérios de utilização:
- obrigatória para substâncias e preparações muito tóxicas e corrosivas;
- obrigatória para as substâncias e preparações a que tenham sido atribuídas as frases R21 ou R24;
- obrigatória para substâncias cancerígenas, mutagénicas ou tóxicas para a reprodução da categoria 3, excepto se os referidos efeitos ocorrerem apenas por inalação das mesmas;
- obrigatória para os peróxidos orgânicos;
- recomendada para substâncias e preparações tóxicas se o valor de DL(índice 50) dérmico for desconhecido, mas a substância ou preparação puder ser nociva por contacto com a pele;
- recomendada para as substâncias e preparações utilizadas na indústria que sejam potencialmente nocivas para a saúde em caso de exposição prolongada.

S37 Usar luvas adequadas:

- Âmbito de aplicação:
- substâncias e preparações muito tóxicas, tóxicas, nocivas ou corrosivas;
- peróxidos orgânicos;
- substâncias e preparações irritantes da pele ou que causem sensibilização por contacto com a pele.
- Critérios de utilização:
- obrigatória para substâncias e preparações muito tóxicas e corrosivas;
- obrigatória para substâncias e preparações a que tenham sido atribuídas as frases R21, R24 ou R43;
- obrigatória para substâncias cancerígenas, mutagénicas e tóxicas para a reprodução da categoria 3, excepto se os referidos efeitos ocorrerem apenas por inalação das mesmas;
- obrigatória para os peróxidos orgânicos;
- recomendada para substâncias e preparações tóxicas se o valor de DL(índice 50) dérmico for desconhecido mas a substância ou preparação puder ser nociva por contacto com a pele;
- recomendada para substâncias e preparações irritantes para a pele.

S38 Em caso de ventilação insuficiente, usar equipamento respiratório adequado:

- Âmbito de aplicação:
- substâncias e preparações muito tóxicas e tóxicas.
- Critérios de utilização:
- limitada, normalmente, a casos especiais de utilização de substâncias e preparações muito tóxicas ou tóxicas, na indústria ou na agricultura.

S39 Usar um equipamento protector para a vista/face:

- Âmbito de aplicação:
- peróxidos orgânicos;
- substâncias e preparações corrosivas, incluindo substâncias e preparações irritantes, que apresentem riscos de danos graves para os olhos;
- substâncias e preparações muito tóxicas e tóxicas.
- Critérios de utilização:
- obrigatória para substâncias e preparações a que tenham sido atribuídas as frases R34, R35 ou R41;
- obrigatória para os peróxidos orgânicos;
- recomendada quando seja necessário chamar a atenção do utilizador, para riscos decorrentes do contacto com os olhos, não referidos nas frases indicadoras de risco atribuídas;
- limitada normalmente, a casos excepcionais de substâncias e preparações muito tóxicas e tóxicas, quando existir o risco de salpicos e quando estas substâncias e preparações forem facilmente absorvidas através da pele.

S40 Para limpeza do chão e objectos contaminados por este produto, utilizar ... (a especificar pelo produtor):

- Âmbito de aplicação:
- todas as substâncias e preparações perigosas.
- Critérios de utilização:
- limitada, normalmente, às substâncias e preparações perigosas para as quais a água não seja considerada um agente de limpeza adequado (por exemplo, quando for necessário recorrer à absorção por uma matéria pulverulenta, a dissolução num solvente, etc.) e aos casos em que, por razões de saúde e ou segurança, seja importante fazer uma advertência no rótulo.

S41 Em caso de incêndio e ou explosão não respirar os fumos:

- Âmbito de aplicação:
- substâncias e preparações perigosas que libertem gases muito tóxicos ou tóxicos durante a combustão.
- Critérios de utilização:
- geralmente limitada a casos especiais.

S42 Durante as fumigações/pulverizações usar equipamento respiratório adequado [termo(s) adequado(s) a especificar pelo produtor]:

- Âmbito de aplicação:
- substâncias e preparações destinadas a estas utilizações mas que possam prejudicar a saúde e a segurança do utilizador se não forem tomadas medidas de precaução apropriadas.
- Critérios de utilização:
- limitada, normalmente, a casos especiais.

S43 Em caso de incêndio, utilizar ... (meios de extinção a especificar pelo produtor. Se a água aumentar os riscos, acrescentar: «Nunca utilizar água»):

- Âmbito de aplicação:
- substâncias e preparações extremamente inflamáveis, facilmente inflamáveis e inflamáveis.
- Critérios de utilização:
- obrigatória para substâncias e preparações que, em contacto com a água ou a humidade do ar, libertem gases extremamente inflamáveis;
- recomendada para as substâncias e preparações extremamente inflamáveis, facilmente inflamáveis e inflamáveis, especialmente quando imiscíveis com a água.

S45 Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível, mostrar-lhe o rótulo):

- Âmbito de aplicação:
- substâncias e preparações muito tóxicas;
- substâncias e preparações tóxicas e corrosivas;
- substâncias e preparações que causem sensibilização por inalação.
- Critérios de utilização:
- obrigatória para as substâncias e preparações acima referidas.

S46 Em caso de ingestão, consultar imediatamente o médico e mostrar-lhe a embalagem ou o rótulo:

- Âmbito de aplicação:
- todas as substâncias e preparações perigosas, excepto as muito tóxicas, tóxicas, corrosivas ou perigosas para o ambiente.
- Critérios de utilização:
- obrigatória para todas as substâncias e preparações acima referidas que possam ser utilizadas pelo público em geral, excepto se não existirem motivos para recear perigos decorrentes da respectiva ingestão, nomeadamente por crianças.

S47 Conservar a uma temperatura que não exceda ...°C (a especificar pelo produtor):

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações que se tornem instáveis a uma determinada temperatura.
- Critérios de utilização:
- limitada, normalmente, a casos especiais (por exemplo, determinados peróxidos orgânicos).

S48 Manter húmido com ... (material adequado a especificar pelo produtor):

- Âmbito de aplicação:
- substâncias e preparações que possam tornar-se muito sensíveis a faíscas, fricção ou choque, no caso de secarem.
- Critérios de utilização:
- limitada, normalmente, a casos especiais, por exemplo, nitroceluloses.

S49 Conservar unicamente no recipiente de origem:

- Âmbito de aplicação:
- substâncias e preparações sensíveis a decomposição catalítica.
- Critérios de utilização:
- substâncias e preparações sensíveis a decomposição catalítica, por exemplo, determinados peróxidos orgânicos.

S50 Não misturar com ... (a especificar pelo produtor):

- Âmbito de aplicação:
- substâncias e preparações que possam reagir com o produto especificado e libertar gases muito tóxicos ou tóxicos;
- peróxidos orgânicos.
- Critérios de utilização:
- recomendada para as substâncias e preparações acima referidas que possam ser utilizadas pelo público em geral, nos casos em que for uma melhor alternativa às frases R31 ou R32;
- obrigatória para determinados peróxidos que possam reagir violentamente com aceleradores ou promotores de processos.

S51 Utilizar somente em locais bem ventilados:

- Âmbito de aplicação:
- substâncias e preparações que possam ou se destinem a libertar vapores, poeiras, aerossóis, fumos, névoas, etc., com riscos por inalação ou com riscos de incêndio ou explosão.
- Critérios de utilização:
- recomendada quando a frase S38 não for adequada. Importante para substâncias e preparações que possam ser utilizadas pelo público em geral.

S52 Não utilizar em grandes superfícies nos locais habitados:

- Âmbito de aplicação:
- substâncias voláteis muito tóxicas, tóxicas e nocivas, e preparações que as contenham.
- Critérios de utilização:
- recomendada quando a saúde puder ser prejudicada por uma exposição prolongada a estas substâncias, devido à sua volatilização a partir de grandes superfícies tratadas, em habitações ou noutros locais fechados onde possam estar pessoas.

S53 Evitar a exposição - obter instruções específicas antes da utilização:

- Âmbito de aplicação:
- substâncias e preparações carcinogénicas, mutagénicas e ou com efeitos tóxicos na reprodução.
- Critérios de utilização:
- obrigatória para as substâncias e preparações acima referidas a que tenha sido atribuída, pelo menos, uma das frases R seguintes: R45, R46, R49, R60 ou R61.

S56 Eliminar este produto e o seu recipiente enviando-os para um local de recolha de resíduos perigosos ou especiais:

- Âmbito de aplicação:
- todas as substâncias e preparações perigosas.

- Critérios de utilização:

- recomendada para todas as substâncias e preparações perigosas que possam ser utilizadas pelo público em geral e que necessitem de uma eliminação especial.

S57 Utilizar um recipiente adequado para evitar a contaminação do ambiente:

- Âmbito de aplicação:

- substâncias a que tenha sido atribuído o símbolo «N».

- Critérios de utilização:

- geralmente limitada a substâncias e preparações que não possam ser utilizadas pelo público em geral.

S59 Solicitar ao produtor/fornecedor informações relativas à recuperação/reciclagem:

- Âmbito de aplicação:

- todas as substâncias e preparações perigosas.

- Critérios de utilização:

- obrigatória para substâncias perigosas para a camada de ozono;

- recomendada para outras substâncias e preparações cuja recuperação/reciclagem seja aconselhável.

S60 Este produto e o seu recipiente devem ser eliminados como resíduos perigosos:

- Âmbito de aplicação:

- todas as substâncias e preparações perigosas.

- Critérios de utilização:

- recomendada para substâncias e preparações que não sejam utilizadas pelo público em geral às quais não tenha sido atribuída a frase S35.

S61 Evitar a libertação para o ambiente. Obter instruções específicas/fichas de segurança:

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações perigosas para o ambiente.

- Critérios de utilização:

- geralmente utilizada para substâncias a que tenha sido atribuído o símbolo «N»;

- recomendada para todas as substâncias classificadas como perigosas para o ambiente ainda não abrangidas.

S62 Em caso de ingestão, não provocar o vômito. Consultar imediatamente um médico e mostrar-lhe a embalagem ou o rótulo:

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações classificadas como nocivas com a frase indicadora de risco R65 de acordo com os critérios definidos no ponto 3.2.3;

- não se aplica às substâncias e preparações colocadas no mercado em recipientes para aerossóis ou em recipientes dotados de um dispositivo de pulverização selado, v. secções 8 e 9.

- Critérios de utilização:

- obrigatória para as substâncias e preparações supramencionadas se forem vendidas ou susceptíveis de serem utilizadas pelo público em geral, excepto se forem obrigatórias as frases S45 ou S46.

- recomendada para as substâncias e preparações supramencionadas quando forem utilizadas na indústria, excepto se forem obrigatórias as frases S45 ou S46.

S63 Em caso de acidente por inalação, transferir o acidentado para um local bem ventilado e mantê-lo em repouso:

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações muito tóxicas e tóxicas (gases, vapores, partículas, líquidos voláteis);

- substâncias e preparações que causem sensibilização respiratória.

- Critérios de utilização:

- obrigatória para substâncias e preparações a que tenham sido atribuídas as frases R26, R23 ou R42 e que possam ser utilizadas pelo público em geral de um modo que possa resultar na sua inalação.

S64 Se engolido, lavar a boca com água (apenas se a pessoa se encontrar consciente):

- Âmbito de aplicação:

- substâncias e preparações corrosivas ou irritantes.

- Critérios de utilização:

- recomendada para as substâncias e preparações supra que possam ser utilizadas pelo público em geral e relativamente às quais seja adequado o tratamento referido.

7 Rotulagem

7.1 Efectuada a classificação da substância ou preparação, o rótulo adequado é estabelecido com base nos requisitos dos artigos 18.º e 19.º do presente Regulamento e do Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, relativos, respectivamente, às substâncias e preparações. No presente capítulo descreve-se o processo para estabelecer a rotulagem e dão-se orientações de prudência apropriadas.

O rótulo compreende as seguintes informações:

a) O nome ou nomes das substâncias em questão;

b) O nome, morada e número de telefone do produtor/importador;

c) Os símbolos e indicações de perigo;

d) Frases indicadoras de riscos específicos (frases R);

e) Recomendações de prudência (frases S);

f) No caso das substâncias, o número CE.

7.1.1 No caso das substâncias que figuram no anexo I do presente Regulamento, o rótulo também deve incluir a indicação «Rótulo CE».

7.1.2 Selecção das frases indicadoras de risco e das recomendações de prudência.

Embora a selecção das frases indicadoras de risco e das recomendações de prudência mais adequadas seja determinada, em primeiro lugar, pela necessidade de fornecer todas as informações indispensáveis, também deve atender-se à clareza e ao impacto do rótulo. Tendo presente essa condicionante, no que se refere à clareza, as informações necessárias deverão ser expressas num número mínimo de frases.

No caso das substâncias e preparações irritantes, facilmente inflamáveis, inflamáveis e comburentes, não será necessário relembrar as frases R e as frases S no rótulo se a embalagem contiver no máximo 125 ml. O mesmo se aplica às substâncias nocivas, com idêntica condicionante em termos de volume e desde que não sejam vendidas a retalho ao público em geral.

7.1.3 No rótulo ou embalagem das substâncias ou preparações sujeitas ao presente Regulamento e ao Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, não poderão figurar menções do tipo: «não tóxico», «não nocivo» ou quaisquer outras indicações análogas.

7.1.4 O Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, contém disposições específicas relativas à rotulagem de algumas preparações.

7.2 Designação ou designações químicas que devem figurar no rótulo:

7.2.1 No rótulo das substâncias enumeradas no anexo I do presente Regulamento deverá figurar uma das designações constantes do anexo I.

No que se refere às substâncias que não figuram no anexo I, o seu nome será estabelecido segundo uma nomenclatura química reconhecida internacionalmente, conforme é definido no ponto 1.4.

7.2.2 Para as preparações, a selecção dos nomes que devem figurar no rótulo será feita de acordo com o disposto no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho.

Nota. - No caso das preparações concentradas destinadas à indústria de perfumaria:

- a pessoa responsável pela sua colocação no mercado poderá identificar apenas a substância sensibilizante que considerar ser a principal responsável pelo efeito de sensibilização;
- no caso de uma substância natural, a designação química poderá ser do tipo: «óleo essencial de ...» «extracto de ...», como alternativa às designações dos componentes do óleo essencial ou extracto.

7.3 Escolha dos símbolos de perigo:

O grafismo dos símbolos de perigo e a redacção das indicações de perigo devem ser conformes com o anexo II. Os símbolos devem ser impressos a preto sobre fundo amarelo-alaranjado.

7.3.1 Os símbolos de perigo e as indicações de perigo correspondentes às substâncias do anexo I são os que figuram no presente anexo.

7.3.2 No caso das substâncias perigosas que ainda não figurem no anexo I e no que se refere às preparações, os símbolos de perigo e as indicações de perigo serão atribuídas de acordo com as regras definidas no presente anexo.

Quando a uma substância for atribuível mais de um símbolo:

- a obrigatoriedade da indicação do símbolo «T» torna os símbolos «X» e «C» facultativos;
- a obrigatoriedade da indicação do símbolo «C» torna o símbolo «X» facultativo;
- a obrigatoriedade da indicação do símbolo «E» torna os símbolos «F» e «O» facultativos.

7.4 Escolha das frases indicadoras de risco:

A redacção das frases R deve estar de acordo com o estabelecido no anexo II do presente Regulamento.

Quando sejam aplicáveis, deverão utilizar-se as frases R combinadas do anexo III.

7.4.1 As frases R correspondentes às substâncias do anexo I são as que figuram no presente anexo.

7.4.2 No caso das substâncias que não figurem no anexo I, as frases R serão seleccionadas de acordo com os critérios e prioridades a seguir definidos:

a) No caso de perigos de que decorram efeitos na saúde:

- i) as frases R correspondentes à categoria de perigo ilustrada por um símbolo deverão figurar no rótulo;
- ii) no que se refere às frases R correspondentes a outras categorias de perigo que não sejam ilustradas por um símbolo, por força do artigo 19.º do presente Regulamento;

b) No caso de perigos decorrentes de propriedades físico-químicas:

- aplicar-se-ão os critérios descritos no ponto 7.4.2, alínea a), com a excepção de não ser necessário incluir as frases indicadoras de risco «extremamente inflamável» ou «facilmente inflamável» se estas repetirem a indicação de perigo ilustrada por um símbolo;

c) No caso de perigos para o ambiente:

- as frases R correspondentes à categoria de classificação «perigoso para o ambiente» deverão figurar no rótulo.

7.4.3 No caso das preparações, as frases R serão seleccionadas de acordo com os critérios e prioridades a seguir definidos:

a) No caso de perigos de que decorram efeitos na saúde:

- i) frases R correspondentes à categoria de perigo ilustrada por símbolo. Em determinados casos, as frases R deverão ser adoptadas de acordo com o Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho. Mais especificamente, deverão figurar no rótulo as

frases R referentes ao ou aos componentes responsáveis pela classificação da preparação numa categoria de perigo;

ii) frases R correspondentes a outras categorias de perigo em que os componentes tenham sido classificados mas que não sejam ilustradas por um símbolo, por força do Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho;

b) No caso de perigos decorrentes de propriedades físico-químicas:

- aplicar-se-ão os critérios descritos no ponto 7.4.3, alínea a), com a excepção de não ser necessário incluir as frases indicadoras de risco «extremamente inflamável» ou «facilmente inflamável» se estas repetirem a indicação de perigo ilustrada por um símbolo.

Como regra geral, será suficiente um máximo de quatro frases R para descrever os riscos decorrentes das preparações. Para este efeito, as frases combinadas do anexo III do presente Regulamento serão consideradas frases simples. No entanto, as frases normalizadas deverão abranger todos os perigos importantes associados à preparação.

Contudo se o produtor for de opinião que devem ser identificados perigos para o ambiente, serão acrescentadas outras frases R, na medida das necessidades.

7.5 Recomendações de prudência:

A redacção das frases S deve estar de acordo com o estabelecido no anexo IV do presente Regulamento.

Quando sejam aplicáveis, deverão utilizar-se as frases S combinadas do anexo IV.

7.5.1 As frases S correspondentes às substâncias do anexo I são as que figuram no presente anexo. Na falta destas, o produtor/importador poderá utilizar uma ou mais frases S apropriadas.

7.5.2 Escolha das frases de segurança:

Na selecção das frases de segurança deverá atender-se às frases indicadoras de risco incluídas no rótulo e também à utilização prevista para a substância ou preparação:

- como regra geral, será suficiente um máximo de quatro frases S para a recomendação de prudência mais adequada; para este efeito, as frases combinadas do anexo IV serão consideradas frases simples;

- no caso das frases S relativas à eliminação, deve utilizar-se uma única frase, excepto se for claro que a eliminação do produto e do seu recipiente não apresenta perigos para a saúde humana e para o ambiente. O fornecimento de recomendações relativas à eliminação segura é importante, nomeadamente, no caso das substâncias e preparações vendidas ao público em geral;

- algumas frases R tornam-se supérfluas se for feita uma selecção cuidadosa das frases S e vice-versa; as frases S que correspondam claramente a frases R só figurarão no rótulo no caso de se pretender reforçar uma determinada advertência;

- na selecção das frases de segurança correspondentes a determinadas substâncias e preparações será necessário ter em especial atenção as condições previsíveis de utilização, por exemplo, por pulverização e outros efeitos de aerossol. A escolha das frases deverá atender à utilização prevista;

- as frases S1, S2 e S45 são obrigatórias para todas as substâncias e preparações muito tóxicas, tóxicas e corrosivas vendidas ao público em geral;

- as frases S2 e S46 são obrigatórias para todas as outras substâncias e preparações perigosas (à excepção das substâncias e preparações apenas classificadas de perigosas para o ambiente) vendidas ao público em geral.

Sempre que as frases seleccionadas de acordo com os critérios estritos referidos no ponto 6.2 resultarem em redundâncias ou ambiguidades ou se revelarem manifestamente desnecessárias em virtude do carácter específico do produto ou da embalagem, podem suprimir-se algumas frases.

7.6 Número CE:

Se uma substância indicada no rótulo figurar no Inventário Europeu das Substâncias Químicas Existentes no Mercado (EINECS) ou na Lista Europeia das Substâncias Químicas Notificadas (ELINCS), os números EINECS ou ELINCS da substância deverão figurar no rótulo. Este requisito não se aplica às preparações.

8 Casos especiais: substâncias

8.1 Garrafas de gás:

No caso das garrafas de gás, considera-se que as exigências em matéria de rotulagem são satisfeitas se forem conformes aos artigos 18.º e 19.º e à alínea b) do n.º 10 do artigo 20.º

Todavia, por derrogação aos n.os 1 a 6 do artigo 20.º, pode utilizar-se uma das seguintes alternativas para garrafas de gás de capacidade inferior ou igual a 150 l de água:

- o formato e as dimensões do rótulo podem ser conformes ao disposto na norma ISO/DP 7225;

- as informações referidas no artigo 18.º e no n.º 3 do artigo 19.º podem ser inscritas num dístico ou rótulo não destacável da garrafa.

8.2 Garrafas de gás destinadas ao propano, butano ou gás de petróleo liquefeito (GPL):

Estas substâncias estão classificadas no anexo I. Embora sejam classificadas em conformidade com o artigo 3.º, não apresentam riscos para a saúde humana quando colocadas no mercado em garrafas recarregáveis ou em cartuchos não recarregáveis, na aceção da norma EN 417, como gases combustíveis apenas utilizados para fins de combustão.

Estas garrafas ou cartuchos devem ser rotulados com o símbolo adequado e igualmente com as frases R e S que indicam a inflamabilidade. Não é necessário inscrever no rótulo informações relativas aos efeitos sobre a saúde humana. Todavia, as informações relativas aos efeitos sobre a saúde humana que deveriam figurar no rótulo terão de ser comunicadas ao utilizador profissional pelo responsável pela colocação da substância no mercado, recorrendo ao modelo previsto no artigo 21.º Devem fornecer-se ao consumidor informações que lhe permitam adoptar todas as medidas necessárias em matéria de saúde e segurança previstas no artigo 22.º

8.3 Metais maciços:

Estas substâncias ou estão classificadas no anexo I ou deverão sê-lo nos termos do n.º 2 do artigo 18.º No entanto, embora algumas das substâncias em causa tenham sido classificadas nos termos do artigo 3.º, não apresentam perigos para a saúde humana por inalação, ingestão ou contacto com a pele, bem como para o ambiente aquático, na forma em que são colocadas no mercado. Tais substâncias não necessitam de ser rotuladas em conformidade com os artigos 18.º e 19.º Todavia, todas as informações que deveriam figurar no rótulo terão de ser comunicadas ao utilizador pelo responsável pela colocação do metal no mercado, num formato previsto no artigo 21.º

8.4 Substâncias caracterizadas com a frase R65:

As substâncias classificadas como nocivas em virtude do risco de aspiração não necessitam de ser classificadas como nocivas e caracterizadas pela frase R65 nos rótulos, se forem colocadas no mercado em recipientes para aerossóis ou em recipientes dotados de um dispositivo de pulverização selado.

9 Casos especiais: preparações

9.1 Preparações gasosas (misturas de gases):

No caso das preparações gasosas, deve ter-se em conta:

- a avaliação das propriedades físico-químicas;
- a avaliação dos perigos para a saúde.

9.1.1 Avaliação das propriedades físico-químicas:

9.1.1.1 Inflamabilidade:

A inflamabilidade destas preparações é determinada nos termos do Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, de acordo com os métodos especificados na parte A do anexo V do presente Regulamento.

Estas preparações deverão ser classificadas em função dos resultados dos ensaios efectuados e tendo em consideração os critérios do anexo V e os critérios do guia de rotulagem.

No entanto, por derrogação, no caso de as preparações gasosas serem produzidas por encomenda em pequenas quantidades, poderá avaliar-se a inflamabilidade dessas misturas gasosas utilizando o seguinte método de cálculo:

a expressão da mistura gasosa

$$A(\text{índice } 1) F(\text{índice } 1) + \dots + A(\text{índice } i) F(\text{índice } i) + \dots + A(\text{índice } n) F(\text{índice } n) + B(\text{elevado a } 1) I(\text{índice } 1) + \dots + B(\text{índice } i) I(\text{índice } i) + \dots + B(\text{índice } p) I(\text{índice } p)$$

em que:

A(índice i) e B(índice i) são as fracções molares;

F(índice i) = gás inflamável;

I(índice i) = gás inerte;

n = número de gases inflamáveis;

p = número de gases inertes;

pode ser convertida numa fórmula em que todos os I(índice i) (gases inertes) são expressos, num equivalente de azoto, utilizando um coeficiente K(índice i) em que o teor equivalente de gás inflamável, A'(índice i) é expresso pela seguinte fórmula:

$$A'(\text{índice } i) = A(\text{índice } i) \times [100 / (A(\text{índice } i) + K(\text{índice } i) B(\text{índice } i))]$$

Utilizando o valor do teor máximo de gás inflamável que, em mistura com azoto, origina uma composição que não é inflamável no ar (Tci), é possível obter a expressão seguinte: (ver fórmula no documento original)

A mistura gasosa será inflamável se o valor da expressão anterior for superior a 1. A preparação será classificada como extremamente inflamável e ser-lhe-á atribuída a frase R12.

Coeficientes de equivalência (K(índice i)):

Os valores dos coeficientes de equivalência K(índice i), entre os gases inertes e o azoto e os valores dos teores máximos (Tci) dos gases inflamáveis figuram nos quadros 1 e 2 da norma ISO 10156, edição de 15 de Dezembro de 1990.

Teor máximo de gás inflamável (Tci):

O valor do teor máximo de gás inflamável (Tci) figura no quadro 2 da norma ISO 10156, edição de 15 de Dezembro de 1990.

No caso de o valor Tci de um gás inflamável não figurar na norma referida, será utilizado o limite inferior de explosividade (LIE) correspondente. Se o valor do LIE não for conhecido, o valor Tci será fixado em 1%, em volume.

Observações

- A expressão anterior pode ser utilizada para permitir a rotulagem adequada de determinadas preparações gasosas; no entanto, não deverá ser considerada como um método alternativo da experimentação, em substituição da determinação dos parâmetros técnicos de segurança.

- Além disso, a expressão não fornece qualquer informação sobre a possibilidade de preparar com segurança uma mistura que contenha gases comburentes. Ao fazer-se uma estimativa da inflamabilidade, esses gases comburentes não são tidos em conta.

- A expressão anterior apenas fornece resultados fiáveis se os gases inflamáveis não se influenciarem reciprocamente no que diz respeito à sua inflamabilidade. Este facto deve ser tido em conta, por exemplo, no caso dos hidrocarbonetos halogenados.

9.1.1.2 Propriedades comburentes:

Atendendo ao facto de o anexo V do presente Regulamento não incluir um método para a determinação das propriedades comburentes de misturas gasosas, a determinação dessas propriedades será efectuada pelo método de estimativa a seguir descrito.

O método fundamenta-se na comparação do potencial comburente dos gases componentes de uma mistura com o potencial de oxidação do oxigénio no ar. As concentrações dos gases na mistura são expressas em percentagem volumétrica.

Considera-se que uma mistura gasosa é tão ou mais comburente do que o ar no caso de se verificar a seguinte condição:

(ver fórmula no documento original)

Nesse caso, a preparação será classificada como comburente e ser-lhe-á atribuída a frase R8.

Coeficientes de equivalência entre gases comburentes e o oxigénio:

Os coeficientes para o cálculo da capacidade comburente de determinados gases, componentes de uma mistura, em relação à capacidade comburente do oxigénio no ar, apresentados no ponto 5.2 da norma ISO 10156, edição de 15 de Dezembro de 1990, são os seguintes:

(ver documento original)

Se, para um determinado gás, não existir nenhum valor do coeficiente C(índice i) na referida norma, ser-lhe-á atribuído o valor 40.

9.1.2 Avaliação dos efeitos na saúde:

A avaliação dos perigos de uma preparação para a saúde é efectuada nos termos do Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho.

Quando a avaliação dos perigos para a saúde for efectuada pelo método convencional descrito no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, tomando como referência os limites de concentração individuais, os limites de concentração individuais a utilizar serão expressos em percentagem volumétrica, figurando:

- quer no anexo I do presente Regulamento, para o(s) gás(es) em questão.

- quer no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, nos casos de os gases considerados não figurarem no anexo I ou nele figurarem sem limites de concentração.

9.1.3 Rotulagem:

No que se refere às garrafas para gases transportáveis, consideram-se os requisitos de embalagem satisfeitos quando for respeitado o disposto no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho.

Todavia, em derrogação ao disposto nos n.os 1 e 2 do artigo 8.º, o formato e as dimensões do rótulo das garrafas para gases cuja capacidade com água não exceda 150 l poderão regular-se pelos requisitos da norma ISO 7225. Nesse caso, o rótulo poderá ter inscrita a designação genérica ou a designação industrial/comercial da preparação, desde que as substâncias perigosas componentes da preparação sejam enumeradas no corpo da garrafa de gás de forma clara e indelével.

As informações especificadas no artigo 7.º podem ser fornecidas na forma de um disco de informação durável ou de um rótulo fixado às garrafas.

9.2 Garrafas para gases destinadas a preparações com propano, butano ou gás de petróleo liquefeito (GPL) a que foram adicionados odorizantes:

O propano, o butano e o gás de petróleo liquefeito são classificados no anexo I. Apesar das preparações que contêm estas substâncias serem classificadas em conformidade com o Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º

1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho, estas não apresentam perigo para a saúde humana quando colocadas no mercado como gases combustíveis libertados unicamente com vista à sua combustão em garrafas cilíndricas herméticas recarregáveis ou em cartuchos não recarregáveis na acepção da EN 417.

Estas garrafas ou cartuchos devem ser rotulados com o símbolo adequado e indicar as frases de risco R e S que indicam a inflamabilidade. Não é necessário inscrever no rótulo informações relativas aos efeitos sobre a saúde humana. Todavia, as informações relativas aos efeitos sobre a saúde humana que deveriam figurar no rótulo terão de ser comunicadas ao utilizador profissional pela pessoa responsável pela colocação da substância no mercado, recorrendo ao modelo previsto no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho. No que diz respeito aos consumidores, deverão ser-lhes fornecidas informações suficientes que lhes permitam tomar todas as medidas necessárias de protecção da saúde e da segurança, tal como previsto no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho.

9.3 Ligas, preparações com polímeros e preparações com elastómeros:

Estas preparações serão classificadas em conformidade com o disposto no artigo 3.º e rotuladas em conformidade com o disposto no Decreto-Lei n.º 120/92, de 30 de Junho, na redacção que lhe foi dada pela Portaria n.º 1152/97, de 12 de Novembro, e pelo Decreto-Lei n.º 189/99, de 2 de Junho.

No entanto, embora algumas destas preparações tenham sido classificadas nos termos do n.º 3 do artigo 3.º, não apresentam perigos para a saúde humana por inalação, ingestão ou contacto com a pele, na forma em que são colocadas no mercado. Tais preparações não necessitam de ser rotuladas em conformidade com o artigo 7.º Contudo, todas as informações que deveriam figurar no rótulo terão de ser comunicadas ao utilizador profissional através de um sistema de informação e recorrendo ao modelo previsto no artigo 10.º do presente Regulamento.

9.4 Preparações classificadas com a frase R65:

As preparações classificadas como nocivas em virtude do risco de aspiração não necessitam de ser classificadas como nocivas e caracterizadas pela frase R65 nos rótulos, se forem colocadas no mercado em embalagens para aerossóis ou em recipientes dotados de um dispositivo de pulverização selado.

9.5 Peróxidos orgânicos:

Os peróxidos orgânicos reúnem as propriedades de uma substância comburente e de uma substância combustível numa única molécula: quando um peróxido orgânico se decompõe, a parte comburente da molécula reage, de forma exotérmica, com a parte combustível (oxidável). Devido às propriedades comburentes, os métodos do anexo V não podem ser aplicados aos peróxidos orgânicos.

Recorrer-se-á ao seguinte método de cálculo baseado na presença de oxigénio activo que a seguir se descreve:

O teor percentual do oxigénio disponível numa preparação que contenha um peróxido orgânico é dado pela fórmula:

(ver fórmula no documento original)»

ANEXO XIV

«ANEXO IX

Parte A

Disposições relativas aos fechos de segurança para crianças

Para além do disposto no n.º 1, alínea e), do artigo 17.º, devem ser equipados com fechos de segurança para crianças todos os recipientes, qualquer que seja a sua capacidade, que

tenham substâncias que representem um risco de aspiração (Xn; R65) e estejam classificadas e rotuladas de acordo com o ponto 3.2.3 do anexo VI, com excepção das substâncias colocadas no mercado sob a forma de aerossóis ou em recipientes equipados com um dispositivo de pulverização selado.

1 - Embalagens para aberturas repetidas:

Os fechos de segurança para crianças utilizados em embalagens para aberturas repetidas devem obedecer à norma ISO 8317 (edição de 1 de Julho de 1989) relativa a embalagens seguras para crianças - exigências e métodos de ensaio de embalagens para aberturas repetidas (Child-resistant packages - Requirements and methods of testing for reclosable packages), adoptada pela Organização Internacional de Normalização (ISO).

2 - Embalagens para uma única utilização:

Os fechos de segurança para crianças usados em embalagens para uma única utilização devem obedecer à norma CEN EN 862 (edição de Março de 1997) relativa a embalagens seguras para crianças - exigências e procedimentos de ensaio de embalagens para uma única utilização, usadas em produtos não farmacêuticos (Packaging - Child-resistant packaging - Requirements and testing procedures for non-reclosable packages for nonpharmaceutical products), adoptada pelo Comité Europeu de Normalização (CEN).

3 - Observações:

1) A comprovação da conformidade com a norma acima referida apenas pode ser certificada por laboratórios que tenham provado que respeitam as normas europeias da série EN 45000.

2) Casos particulares:

Se parecer evidente que uma embalagem é suficientemente segura para as crianças, por estas não poderem ter acesso ao seu conteúdo sem a ajuda de um utensílio, o ensaio pode não ser efectuado.

Em todos os outros casos e quando houver razões validamente justificadas para duvidar da eficácia do fecho de segurança para crianças utilizado, a autoridade nacional pode pedir ao responsável pela colocação no mercado o fornecimento de uma declaração passada por um laboratório de ensaios do tipo acima definido no ponto 3.1, certificando que:

- o tipo de fecho utilizado é tal que não necessita de ensaios segundo as normas ISO e CEN supramencionadas; ou

- o fecho em questão foi sujeito a ensaios, sendo considerado conforme à norma supramencionada.

Parte B

Disposições relativas aos dispositivos que permitem detectar os perigos pelo tacto

As prescrições técnicas relativas aos dispositivos que permitem detectar os perigos pelo tacto devem ser conformes à norma EN ISO 11683 (edição de 1997) relativa a indicações de perigo detectáveis pelo tacto (Packaging - Tactile warnings of danger - Requirements).»