

DIRECTIVA 2000/33/CE DA COMISSÃO**de 25 de Abril de 2000****que adapta ao progresso técnico pela vigésima sétima vez a Directiva 67/548/CEE do Conselho, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas^(*)****(Texto relevante para efeitos do EEE)**

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

ADOPTOU A PRESENTE DECISÃO:

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Artigo 1.º

Os textos dos anexos I e II da presente directiva são acrescentados à parte B do anexo V da Directiva 67/548/CEE.

Tendo em conta a Directiva 67/548/CEE do Conselho, de 27 de Junho de 1967, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas⁽¹⁾, com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 1999/33/CE do Parlamento Europeu e do Conselho⁽²⁾, e, nomeadamente o seu artigo 28.º,

Artigo 2.º

1. Os Estados-Membros porão em vigor as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente directiva o mais tardar em 1 de Outubro de 2001. Desse facto informarão imediatamente a Comissão.

Considerando o seguinte:

As disposições adoptadas pelos Estados-Membros farão referência à presente directiva ou serão acompanhadas da referida referência aquando da sua publicação oficial. As modalidades da referência são adoptadas pelos Estados-Membros.

(1) O anexo V da Directiva 67/548/CEE estabelece os métodos para a determinação das propriedades físico-químicas, da toxicidade e da ecotoxicidade de substâncias e preparações. A adaptação ao progresso técnico desse anexo é necessária.

2. Os Estados-Membros comunicarão à Comissão as principais disposições de direito interno que adoptarem no domínio abrangido pela presente directiva, bem como uma tabela de correlação entre a presente directiva e as disposições de direito interno adoptadas.

(2) O n.º 2 do artigo 7.º da Directiva 86/609/CEE do Conselho, de 24 de Novembro de 1986, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas dos Estados-Membros respeitantes à protecção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos⁽³⁾, prevê que não deve ser realizada uma experiência se, para obter o resultado desejado, for razoável e praticamente possível utilizar outro método cientificamente satisfatório que não implique a utilização de um animal.

Artigo 3.º

A presente directiva entra em vigor no terceiro dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.

(3) A Comissão tenciona introduzir no anexo V da Directiva 67/548/CEE métodos de ensaio alternativos que não implicam a utilização de um animal, para que possam ser utilizados no ensaio de substâncias químicas, na acepção do n.º 1 do artigo 3.º da Directiva 67/548/CEE.

Artigo 4.º

Os Estados-Membros são os destinatários da presente directiva.

(4) O disposto na presente directiva está em conformidade com o parecer do Comité para a adaptação ao progresso técnico das directivas que visam a eliminação dos entraves técnicos ao comércio no sector das substâncias e preparações perigosas,

Feito em Bruxelas, em 25 de Abril de 2000.

Pela Comissão
Margot WALLSTRÖM
Membro da Comissão

(*) Adoptada antes da vigésima sexta adaptação.

⁽¹⁾ JO 196 de 16.8.1967, p. 1.

⁽²⁾ JO L 199 de 30.7.1999, p. 57.

⁽³⁾ JO L 358 de 18.12.1986, p. 1.

ANEXO I

«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) (1) (2) (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) (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.

Ver 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 ver 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) (4) (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, ver a referência (6)], a fim de reduzir o número de falsos positivos característico dos ensaios deste tipo de substâncias químicas (2) (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 pêlos 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 anfotericina 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 μ 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 μ 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 (ver 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 kΩ/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 kΩ, 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:

Controlo	Substância	Gama de resistência (kΩ)
Positivo	Ácido clorídrico 10 M (36%)	0,5-1,0
Negativo	Água destilada	10-25

1.5.3.3. Procedimento alterado para as substâncias tensioactivas e para as substâncias orgânicas neutras

Se os valores de TER das substâncias de ensaio que sejam tensioactivas ou que sejam substâncias orgânicas neutras forem inferiores ou iguais a 5 kΩ, poderá proceder-se a uma avaliação da penetração de corantes nos tecidos. Esse procedimento permitirá determinar se os resultados são ou não falsos positivos (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 µl 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 = $8,7 \times 10^4$; 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:

Controlo	Substância	Gama de teores em corante (µg/disco)
Positivo	Ácido clorídrico 10 M (36%)	40-100
Negativo	Água destilada	15-35

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 (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 kΩ 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 (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 (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 µl/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 (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 (2). O disco de pele é colocado numa solução MTT a 0,3 mg/ml, a 20-28°C, durante 3 horas. O precipitado azul de formazan é depois extraído (extração com solvente) e a sua concentração é medida através da determinação da DO a um comprimento de onda entre 545 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 impacto 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 (3). Um dos factores críticos será a demonstração da reprodutibilidade do método utilizado infra e inter-laboratórios para diversos produtos químicos, de acordo com as normas internacionais. O método deverá cumprir, no mínimo, os critérios de validade científica já definidos (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 (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:

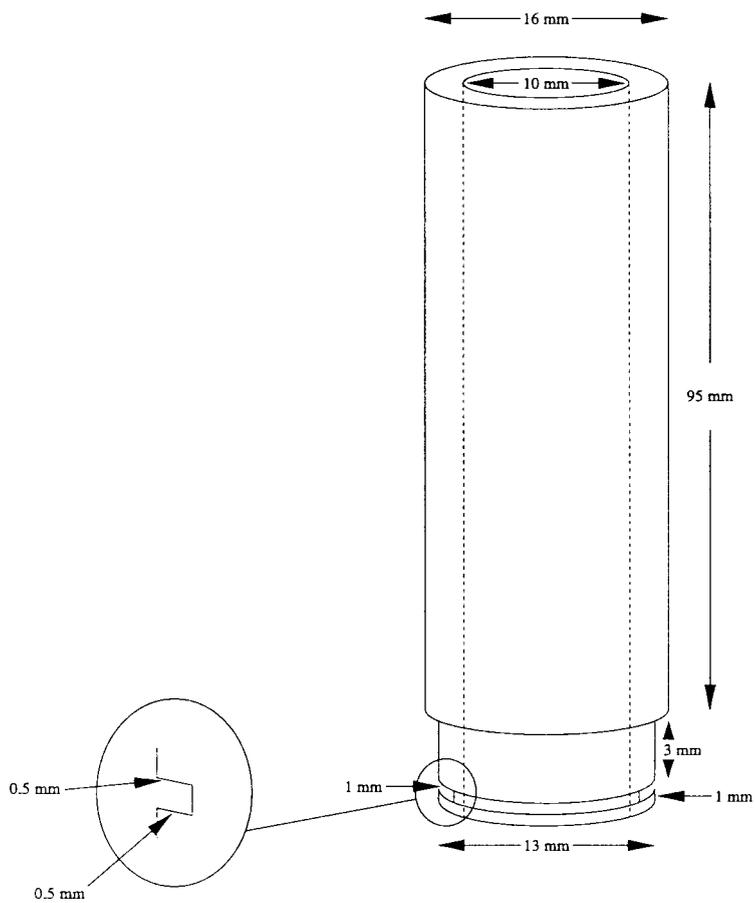
- tabelas com os valores de resistência (ensaio TER) ou com as percentagens de viabilidade celular (ensaio em modelo de pele humana) dos materiais de ensaio, dos controlos positivo e negativo e de qualquer produto químico padrão que tenha sido utilizado, incluindo todos os dados relativos aos replicados/repetição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

*Discussão dos resultados.**Conclusões.***4. BIBLIOGRAFIA**

- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, *ATLA* 26, p. 275-280.
- (2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhtuter, 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.
- (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.
- (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.
- (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.
- (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.
- (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



Dimensões do eléctrodo

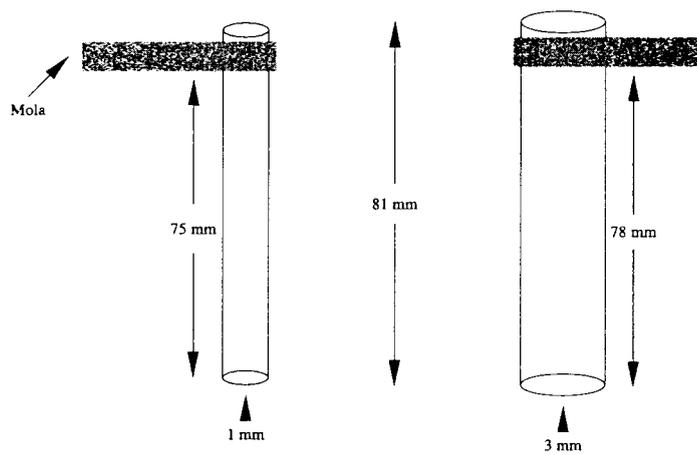
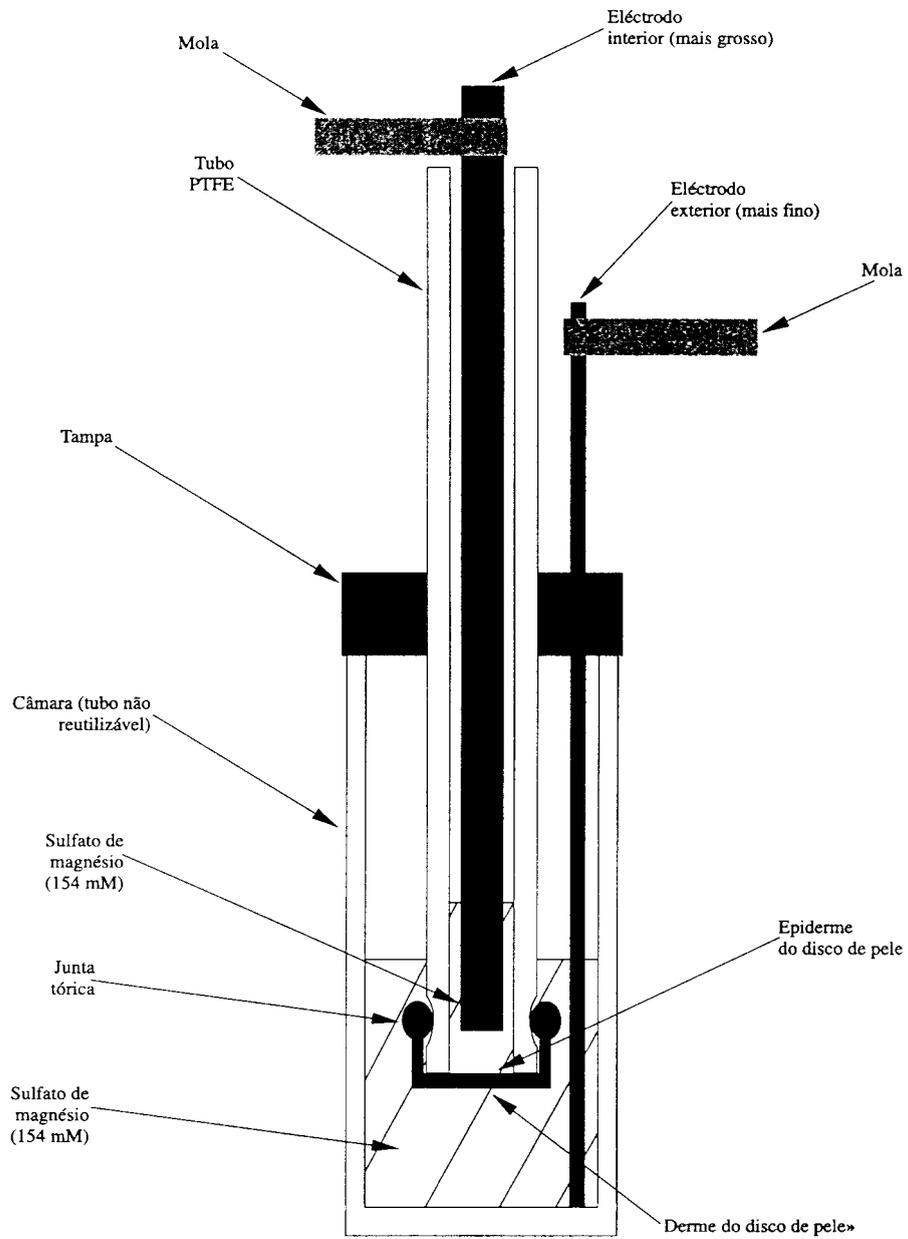


Figura 2

Montagem para o ensaio TER em pele de rato



ANEXO II

«B.41. FOTOTOXICIDADE — ENSAIO DE FOTOTOXICIDADE — *IN-VITRO* 3T3 NRU1 **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 da 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 (1) (2) (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 (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 × tempo) de radiação ultravioleta (UV) ou visível que incide numa superfície, expressa em joules (= W × 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 (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (100-280 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 (EC₅₀) da substância em estudo, respectivamente sem (-UV) e com exposição (+UV) a uma dose não citotóxica de radiação UVA/visível.

MPE (mean photo effect — Fotefeito 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 (1) (3) (13).

1.4 Considerações preliminares

Existem inúmeras referências aos efeitos fototóxicos de muitas substâncias (5) (6) (7) (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 fotoreacção. 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 $10 \text{ litro} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, 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 (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 (9)] 24 horas após a administração da substância em estudo e a irradiação.

Efectua-se uma cultura de células Balb/c 3T3 durante 24 h, até à formação de monocamadas. Para cada substância em estudo, procede-se à pré-incubação, durante 1 h, 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/cm^2 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 h, determina-se a viabilidade celular por análise da absorção do vermelho neutro (*neutral red uptake* — NRU) durante 3 h. 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_{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/cm^2 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/cm^2 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/cm^2 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 ($OD_{540\text{ NRU}}$) determinada no extracto NR das amostras de controlo negativas indica se as 1×10^4 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 ($OD_{540\text{ NRU}}$) 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), $EC_{50} = 0,1$ a $2,0\ \mu\text{g/ml}$; CPZ não irradiada (-UVA), $EC_{50} = 7,0$ a $90,0\ \mu\text{g/ml}$. O factor de fotoirritação (PIF), ou seja, a variação da EC_{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_{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_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 h após a inoculação das células. No caso das células Balb/c 3T3 cultivadas em placas de 96 alvéolos, recomenda-se uma densidade de 1×10^4 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 (7) (10), enquanto que a gama do UVB possui menor importância neste domínio, apresentando em contrapartida uma elevada citotoxicidade directa que é multiplicada por 1 000 entre 313 e 280 nm (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 devidos 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 (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 espectrorradiómetro 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 min, 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:

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

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 (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 a 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 ⁽¹⁾

1.7.3.1 Primeiro dia

Prepara-se uma suspensão de 1×10^5 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 células/ml (= 1×10^4 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 h (7,5% CO₂, 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 µl de EBSS/PBS. Adicionam-se 100 µl 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, 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, 37°C) até ao dia seguinte (18-22 h).

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 *in 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 µl de EBSS/PBS pré-aquecida. Remove-se a solução de lavagem sacudindo ligeiramente. Adicionam-se 100 µl de meio com NR e incuba-se durante 3 h a 37°C, em atmosfera húmida com 7,5% CO₂.

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 µl de solução de desorção do NR (solução de etanol/ácido acético recentemente preparada).

Agita-se rapidamente a placa num agitador de microplacas durante 10 min, 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.

⁽¹⁾ A referência bibliográfica 12 contém informações complementares.

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). 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 (14). Antes de utilizar um determinado valor de EC₅₀ nos cálculos posteriores, deve comprovar-se devidamente a qualidade do ajustamento. Podem também utilizar-se no cálculo do valor de EC₅₀ 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:

$$(a) \quad PIF = \frac{EC_{50} (-UV)}{EC_{50} (+UV)}$$

A obtenção de um valor PIF < 5 traduz a ausência de potencial fototóxico, enquanto que um PIF ≥ 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 ">PIF" se o ensaio de citotoxicidade (-UV) tiver decorrido até à concentração de ensaio máxima (C_{max}), valor que se utiliza no cálculo de ">PIF":

$$(b) \quad >PIF = \frac{C_{max} (-UV)}{EC_{50} (+UV)}$$

Caso se obtenha apenas um valor ">PIF", qualquer valor superior a 1 traduz um potencial fototóxico.

Se não for possível calcular a EC₅₀ (-UV) nem a EC₅₀ (+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 "PIF = *1" teórico para caracterizar o resultado.

$$(c) \quad PIF = *1 = \frac{C_{max} (-UV)}{C_{max} (+UV)}$$

Caso se obtenha apenas um valor "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 (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 (13). Este modelo permite superar a limitação do modelo baseado no PIF nos casos em que não é possível obter um valor de EC_{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 ($PIF \geq 5$ ou $MPE \geq 0,1$) 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 ($EC_{50} + UV$ e $EC_{50} - UV$) 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 n.º 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_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 CO₂, 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 EC₅₀ (+UVA) e EC₅₀ (-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:
 - EC₅₀ (+UVA), EC₅₀ (-UVA) e PIF da substância de controlo positivo
 - dados de referência da substância de controlo positivo: EC₅₀ (+UVA), EC₅₀ (-UVA) e PIF, média e desvio-padrão.

*Discussão dos resultados.**Conclusões.*

BIBLIOGRAFIA

- (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.
- (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.
- (3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clotier, 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.
- (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.
- (5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, pp. 95-102.
- (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.
- (7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994), *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, *ATLA* 22, pp. 314-348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, pp. 79-110.
- (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.
- (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.
- (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.
- (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".
- (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.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, pp. 127-138.
- (15) Holzhütter, H.G. (1997), A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals, *ATLA* 25, pp. 445-462.

Apêndice

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

